

## БАКТЕРИИ В ПРОМЫШЛЕННОМ СИНТЕЗЕ ОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ



**В.А. Демаков,**  
*доктор медицинских наук,  
директор Института экологии  
и генетики микроорганизмов  
УрО РАН*



**А.Ю. Максимов,**  
*кандидат биологических наук,  
старший научный сотрудник,  
Институт экологии и генетики  
микроорганизмов УрО РАН*

Одной из наиболее актуальных областей биотехнологии в настоящее время является разработка и внедрение биокаталитических процессов синтеза и трансформации органических соединений. Важным направлением исследований является синтез производных карбоновых кислот – мономеров для полимерной химии и соединений фармацевтического назначения. Активное развитие работ в данном направлении связано с успешным опытом применения биомассы бактерий-продуцентов внутриклеточных ферментов нитрилгидратаз как биокатализаторов для крупнотоннажного производства акриламида из акрилонитрила.

### ПРОИЗВОДНЫЕ КАРБОНОВЫХ КИСЛОТ В НАРОДНОМ ХОЗЯЙСТВЕ

Карбоновые кислоты, нитрилы, амиды и эфиры широко используются во всех отраслях промышленности: в производстве различных полимерных материалов, в химическом синтезе других соединений, в качестве растворителей и др. В то же время многие производные карбоновых кислот – токсичные вещества, распространенные техногенные загрязнители окружающей среды. Опасность для природы и человека представляют также традиционные способы их производства и переработки, сопровождающиеся большим объемом вредных стоков и выбросов, побочных продуктов, необходимостью сложных систем очистки.

В химической промышленности широко используются нитрилы карбоновых кислот – органические соединения, со-

держащие одну или несколько цианогрупп ( $-C\equiv N$ ). Нитрилы применяются как сырье для производства различной химической продукции (амины, амиды, карбоновые кислоты, эфиры, альдегиды, гетероциклические соединения, акриламид, полиакриламид, нитрилбутадиеновая резина, акрилонитрилбутадиенстирин и стиринакрилонитриловые полимеры), а также в качестве растворителей, рекристаллизирующих агентов, предшественников фармакологических средств, пестицидов. Нитрилы (органоцианиды) являются высокотоксичными соединениями (Акрилонитрил, 1987). Применение этих продуктов в промышленности, а также как пестицидов в сельском хозяйстве привело к их распространению в окружающей среде. Поэтому существует проблема создания эффективных способов их утилиза-

ции и деградации.

Сложные эфиры карбоновых кислот используются в качестве органических растворителей, адгезивных и повышающих водонепроницаемость добавок в бетонные смеси, компонентов лакокрасочных и грунтовочных составов для антикоррозионной защиты металлов в автомобильной промышленности, пластификаторов в клеях и пластырях медицинского назначения. Многие из этих соединений также представляют опасность для живых организмов в связи с высокой токсичностью.

Непредельные соединения (акрило-

нитрил, акриламид, акриловая кислота и ее соли, бутилакрилат и др.) являются мономерами в производстве полимерных материалов различного назначения – флокулянтов для подготовки питьевой воды и очистки стоков, суперабсорбентов для получения гигиенических средств и медицинских материалов, клеевых составов, строительных материалов, пластических масс с широким спектром физико-химических свойств и потребительских качеств. Мировая потребность в этих продуктах огромна, удовлетворена не полностью и ежегодно возрастает (Аликин и др., 1999).

## БИОКАТАЛИЗ В ОРГАНИЧЕСКОМ СИНТЕЗЕ

Катализаторы, вещества (чаще неорганические), многократно ускоряющие реакцию, направляя ее по новому пути с низкой энергией активации, традиционно используются в органическом синтезе, в том числе в промышленных химических технологиях.

Наиболее быстро развивается такая область биотехнологии, как биокатализ и биотрансформация органических соединений. Это процессы химического превращения одного или нескольких веществ, протекающие под действием эффективных катализаторов – ферментов микробных, животных или растительных клеток. В случае когда ферменты являются внутриклеточными, биокатализатором называют клеточную массу в свободном

либо иммобилизованном состоянии.

Ферменты – высокомолекулярные соединения белковой природы. Частица фермента состоит из одной, нескольких или нескольких десятков белковых молекул (полипептидных цепей), уложенных в сложную пространственную структуру (рис.1), обычно состоящую из подвижных частей-доменов. На частице фермента есть специализированные активные центры, узнающие субстрат и катализирующие его превращение, а также другие участки, управляющие каталитической активностью. Активный центр сложен из нескольких аминокислотных остатков, расположенных определенным образом для каждого конкретного фермента, а также может содержать небелковые части

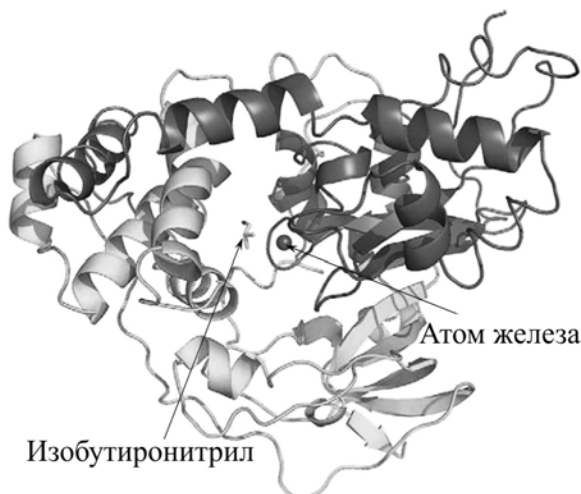


Рис. 1. Структура нитрилгидратазы из *R. erythropolis*

(координационно или ковалентно связанные атомы или ионы каких-либо элементов либо небелковые органические молекулы), называемые простетическими группами. Другие ферменты простетических групп не содержат, но в каталитическом процессе используют растворимые кофакторы – коферменты, являющиеся в реакции, например, донорами или акцепторами электронов.

Отдельные атомы или группы активного центра выполняют различные функции: координируют и высокоспецифично связывают молекулу (или молекулы) органического субстрата; вызывают перераспределение электрического заряда в связанной молекуле; изменяя при взаимодействии с субстратом или промежуточной формой его превращения в продукт собственный заряд или положение, дают сигнал к некоторому преобразованию пространственной структуры активного центра и/или всего белка, делая ее наиболее благоприятной для конкретного этапа каталитического акта; если это реакция с участием неорганического или низкомолекулярного соединения (гидролиз, гидратация, окисление и др.) – связывают это соединение и превращают его в наиболее реакционно-способную форму (перераспределяют заряд, частично окисляют или восстанавливают или др.).

В ходе каталитического акта белковая частица претерпевает пространственные конформационные изменения, создавая молекуле субстрата или формируемого промежуточного соединения микроокружение, способствующее максимальной эффективности реакции. После отсоединения продукта реакции, константа связывания которого на порядки меньше, чем для субстрата, частица фермента находится в исходном конформационном состоянии, в готовности принять новую молекулу субстрата. За секунду реакции каждая частица фермента претерпевает тысячи, десятки или сотни тысяч оборотов (полных каталитических циклов).

Таким образом, фермент представляет собой манипулятор нанометрового размера, производящий сложную работу с субстратом, чаще всего без внешнего источ-

ника энергии, позволяя протекать даже таким реакциям, которые в естественных условиях не наблюдаются, т.к. их скорость в отсутствие фермента ничтожно мала.

Структура ферментов чрезвычайно разнообразна и подчинена выполняемым ими реакциям. В живой клетке одновременно могут присутствовать более тысячи ферментов, каждый из которых осуществляет свойственную только ему реакцию (или группу родственных реакций). У каждого организма (и в клетках разного типа одного организма) есть свой набор ферментов, что и обуславливает все многообразие жизни. Живые организмы представляют собой неиссякаемый источник биокатализаторов для бесконечного количества реакций окисления-восстановления, переноса групп и радикалов, гидролиза, присоединения и расщепления, изомеризации, лигирования.

Вследствие описанных особенностей структуры и функционирования ферменты отличаются от известных химических катализаторов несколькими важными свойствами:

1. Это самые высокоэффективные из известных групп катализаторов. Они увеличивают скорости химических реакций на несколько порядков больше, чем любой другой катализатор.

2. Ферменты работают в «мягких» условиях – в водной среде (но есть возможность использовать ряд ферментов в органической фазе), при физиологических значениях температуры (4–60°C, чаще всего 20–30°C) и pH (обычно от 2 до 13, чаще всего в интервале от 5 до 9), нормальном атмосферном давлении. В то же время традиционные химические каталитические процессы при значительно меньшей эффективности обычно требуют высоких значений температуры и давления, применения агрессивных сред.

3. Ферменты отличаются исключительно высокой специфичностью: как в простых растворах, так и в сложных смесях трансформируют только определенный субстрат в определенный продукт, другие реакции полностью отсутствуют, побочные продукты не образуются. В

традиционном химическом синтезе часто образуются различные побочные продукты, что обуславливает необходимость сложных систем очистки конечного продукта.

4. Многие ферменты обладают стереоселективностью, трансформируя из рацемической смеси субстрата лишь один стереоизомер или превращая стерически неактивное вещество исключительно в один стереоизомер.

С доисторических времен человек использовал ферментативные процессы, в частности процессы брожения, для получения различных пищевых продуктов и материалов. Органический синтез является новой сферой применения каталитически активных белков, дающей возмож-

ность значительно более эффективно и экономично производить многие органические вещества, получать стереоизомеры и новые соединения сложной структуры, синтез которых другими способами сложен или невозможен, высокоспецифично производить трансформацию в сложных смешанных средах. При биокатализе отсутствует необходимость применения высоких температур, давлений, агрессивных сред, отсутствуют побочные продукты, субстрат часто вырабатывается до концентраций, которые не детектируются аналитическими методами. Поэтому применение биотехнологии делает химическое производство технологически простым, мало- или безотходным, экологически безопасным.

### БИОТРАНСФОРМАЦИЯ НИТРИЛОВ, СИНТЕЗ АКРИЛАМИДА И АКРИЛАТОВ

В настоящее время для производства полимеров и сополимеров различного назначения широко применяются акриламид и акриловая кислота (рис. 2). Уникальные физико-химические свойства акриловых полимеров определяют самый широкий спектр областей их применения:

в производстве поверхностных покрытий, твердого смешанного ракетного топлива, оптики, высокоточных приборов, особо прочных клеев, пластических масс и изоляторов, суперабсорбирующих веществ, осветительной арматуры, герметиков, моющих средств, текстиля, полирующих



Рис. 2. Применение акриловых мономеров и полимеров

составов, диспергирующих и загущающих агентов, флокулянтов для подготовки питьевой воды, воды технического назначения, очистки промышленных стоков (Аликин и др., 1999, Ahmed, Trieff, 1983). На протяжении последних двух десятилетий спрос на товарные акриловые мономеры растет на 3–5 % в год. Потребности российской экономики в этой продукции удовлетворены лишь частично за счет импорта и нескольких опытно-промышленных производств.

Традиционно для промышленного производства акриламида применялись процессы каталитической гидратации акрилонитрила с использованием медных катализаторов или серной кислоты. Такой синтез энергоемок и многостадийен, проходит при высокой температуре (190–250°C), сопровождается накоплением побочных продуктов реакции, неполной трансформацией сырья, требует дополнительных стадий очистки конечного продукта. Химический синтез акриловой кислоты, а также других амидов и карбоновых кислот имеет аналогичные недостатки (Аликин и др., 1999, Kobayashi et al., 1992).

Альтернативой энергоемким и сложным методам химического синтеза амидов и карбоновых кислот является биокаталитический способ конверсии нитрилов в соответствующие амиды и/или кислоты, который выгодно отличается от традиционных процессов мягкими условиями проведения: нормальные значения температуры (10–30°C), атмосферное давление, водная среда, близкие к нейтральным значения pH и близкая к 100 % трансформация субстрата в целевое вещество без образования побочных продуктов.

Биотехнологический способ получения акриламида состоит в применении флокулированной активной биомассы бактерий в качестве катализатора для гидратации или гидролиза нитрилов. В отличие от химического катализа биотехнологическая конверсия нитрилов обладает рядом важных преимуществ. Это одностадийный, экологичный, высокоспецифичный, безотходный процесс. Эффективность конверсии составляет 99,8 %,

специфичность – около 100 %. Вследствие простоты, высокой скорости и специфичности биокаталитический синтез не нуждается в сложном аппаратном оформлении. В промышленном варианте он производится в одном реакторе емкостного или колонного типа с минимальной обвязкой. После этапа синтеза полученный раствор содержит лишь механические примеси в виде шлама биокатализатора или абразивного намола, которые удаляются фильтрованием или центробежной сепарацией.

Таким образом, биотехнологический процесс синтеза акриламида не нуждается в сложных системах очистки продукта и отработанного воздуха, не имеет жидких стоков и отходов. Аналогичные процессы биотрансформации могут применяться также в производстве многих других органических соединений.

Биотехнологическое производство акриламида – это первый пример успешного применения биотехнологии в области крупнотоннажного химического синтеза (Asano et al., 1982). Впервые он был внедрен в Японии (Nitto Chemical) и на основе биокатализатора, разработанного в ГосНИИ генетики и селекции микроорганизмов, в России – на ФГУП «Пермский завод им. С.М. Кирова» и на предприятии «Москва-Штокгаузен-Пермь» (г. Пермь), а также на ОАО «Бератон» (г. Березники, Пермский край). В настоящее время этот способ производства применяется и в других странах мира (Корея, Китай, Франция).

На сегодняшний день в России отсутствует современное, экологически безопасное производство акриловой кислоты и продукции на ее основе (на мировом рынке ежегодно реализуется более 1 млн. т акриловой продукции, и спрос на нее стабильно возрастает). Потребности российской экономики в этой продукции удовлетворены лишь частично за счет импорта. Биотехнологическое производство акрилата впервые в мире внедряется на предприятии ЗАО «Москва-Штокгаузен-Пермь». В качестве биокатализатора используются клетки штамма *Alcaligenes denitrificans* C-32, обладающие нитрилаз-

ной активностью (Полтавская и др., 2004).

Привлекательна также возможность применения бактерий для получения некоторых других продуктов, например никотинамида, никотиновой кислоты, бутилакрилата, метилакрилата и др. А значит, актуальны поиск и селекция новых штаммов, трансформирующих нитрилы карбоновых кислот.

Преодоление современных и предотвращение вероятных экологических бедствий, связанных с расширением промышленного производства и техногенными катастрофами, невозможно без применения микробных технологий в области очистки сточных вод, обезвреживания газовых выбросов, утилизации твердых и жидких промышленных отходов, восстановления загрязненных почв, замены ряда агрохимикатов на биотехнологические препараты и т.д. Важнейшими направлениями являются микробиологическая деструкция токсичных химических загрязнителей окружающей среды, применение биоиндикации и биотестирования в системе экологического мониторинга. Проблема утилизации химических отходов может быть решена микробиологическим способом. Большой интерес представляет также селекция и исследование бактерий, активно трансформирующих производные карбоновых кислот, в целях создания экологически безопасных биокаталитических производств.

Очевидно, что активные бактерии-де-

структоры путем естественной селекции накапливаются в грунтах, загрязненных соответствующими химическими соединениями. Это подтверждается результатами селекционной работы, проводимой многими научными коллективами, а также нашими исследованиями разнообразия микроорганизмов-деструкторов. Кроме того, широчайшим спектром метаболической активности в отношении различных органических соединений как биогенного, так и техногенного происхождения обладают микробные биоценозы (микробоценозы) почв и водоемов естественной среды.

Поэтому представляет интерес проведение исследований в области экологии микроорганизмов, трансформирующих органические соединения, характеристика их биоразнообразия, изучение генетических и биохимических механизмов регуляции их метаболической активности, селекция новых штаммов, перспективных для биотехнологии.

В настоящее время есть ряд примеров успешных экологически безопасных биокаталитических производств важных химических продуктов, основанных на использовании в качестве катализатора биомассы бактерий, проявляющих сверхпродукцию катаболических ферментов. Однако, несмотря на значительные успехи в области селекции продуцентов ферментов, потребность промышленности в новых биокатализаторах непрерывно возрастает.

## МИКРООРГАНИЗМЫ-ПРОДУЦЕНТЫ НИТРИЛГИДРОЛИЗУЮЩИХ ФЕРМЕНТОВ

Биотрансформация нитрилов может осуществляться посредством различных метаболических процессов:

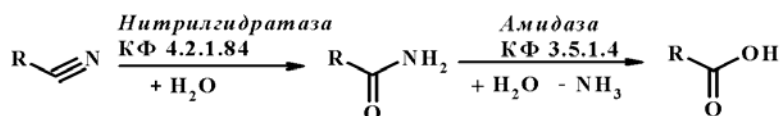
- 1) двухстадийного гидролиза, в котором участвуют два фермента: нитрилгидратаза и амидаза;
- 2) одностадийного гидролиза, осуществляемого нитрилазой;
- 3) окисления, катализируемого оксигеназой, с последующим гидролизом оксинитрилазой;
- 4) восстановления с участием нитрогена-

зы.

Бактериальный метаболизм нитрилов может осуществляться посредством двух альтернативных ферментных систем (рис.3):

- 1) прямого гидролиза нитрилов до соответствующих карбоновых кислот и аммония ферментом нитрилазой (КФ 3.5.5.1);
- 2) двухстадийной трансформацией нитрила через промежуточный амид, катализируемой двумя ферментами: нит-

### Нитрилгидратазный путь



### Нитрилазный путь

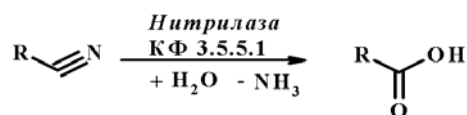


Рис. 3. Пути биотрансформации нитрилов у бактерий

рилгидратазой и амидазой. На первом этапе нитрилгидратаза (КФ 4.2.1.84) гидратирует нитрил до соответствующего амида, затем амидаза (КФ 3.5.1.4) осуществляет гидролиз амида до соответствующей карбоновой кислоты и аммония.

Впервые нитрилаза была обнаружена в 1964 году у растений (Thimann, Mahadevan, 1964). Авторами исследована трансформация индол-3-ацетонитрила в индол-3-уксусную кислоту (ауксин) нитрилазой из ячменя, а также показано, что нитрильные соединения являются естественными метаболитами высших растений, интермедиатами в биосинтезе ауксинов, гормонов растений и компонентов системы защиты от патогенов.

Большинство растений секретируют нитрильные метаболиты в почву в составе экссудата ризосферы корней. Вероятно, с этим связано приобретение и широкое распространение в процессе эволюции способности микроорганизмов к ассимиляции нитрилов. Нитрилазы растений участвуют в процессах метаболизма цианогликозидов.

Способность микроорганизмов разлагать эфиры карбоновых кислот обусловлена наличием у них эстеразы – фермента, обладающего значительным биотехнологическим потенциалом благодаря его высокой стереоселективности.

Биотрансформация ацетонитрила и других предельных алифатических нитрилов впервые описана у бактерий *Arthrobacter* sp. J-1 (Asano et al., 1982b) и *Nocardia rhodochrous* LL100-21 (Knowles,

Collins, 1983). Позднее способность к метаболизму нитрилов была обнаружена у мезофильных бактерий рода *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Alcaligenes*, *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Comamonas*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Nocardia* и др. (Cowan et al., 1998, Banerjee et al., 2002). В 1997 г. Крамп с соавторами сообщили о термофильной бактерии *Bacillus pallidus*, обладающей нитрилдеградирующими ферментами (Cramp et al., 1997). Часто у бактерий одновременно обнаруживаются как нитрилгидратаза, так и нитрилаза. Выявлены альдоксим-деградирующие штаммы *Bacillus* и *Rhodococcus*, которые метаболизируют альдоксимы через нитрильные соединения до карбоновых кислот посредством нового фермента альдоксимдегидратазы и ферментов гидролиза нитрилов (Kato et al., 1999, 2000).

Нитрилметаболизирующие бактерии различаются по способности трансформировать тот или иной нитрил (субстратной специфичности). Штамм *R. rhodochrous* K22, обладающий нитрилазной активностью, способен трансформировать широкий спектр алифатических и ароматических нитрилов, включая глутаронитрил. Продукент нитрилгидратазы *R. rhodochrous* N-774 показал высокую активность в реакции синтеза акриламида и способность к утилизации различных моно- и динитрилов, но практически не использовал ароматические нитрилы в качестве ростового субстрата. Известны микроорганизмы *R. rhodochrous* J1, LL100-21 и *B. pallidus* Dac521, содержа-

щие две ферментные системы: нитрилгидратазно-амидазную и нитрилазную, проявление активности которых зависит от условий роста бактерий. Штамм *R. rhodochrous* J1 эффективно утилизировал ароматические нитрилы (бензонитрил, 3-хлоробензонитрил и др.) посредством нитрилазы. При добавлении в среду ионов кобальта нитрилазная активность снижалась, а нитрилгидратазная появлялась и увеличивалась при добавлении в эту же среду алифатических нитрилов или амидов. В работе N. Layh определена корреляция между химической структурой нитрила, используемого для обогаще-

ния культуры, и ферментными системами, обнаруженными в получаемых изолятах микроорганизмов. При использовании 2-фенилбутиронитрила, 2-(2-метокси-фенил) пропионитрила и бензонитрила выделены грамположительные микроорганизмы, в основном рода *Rhodococcus*, преимущественно обладающие нитрилгидратазно-амидазной системой.

В последние годы интенсивно исследуется структура генов, механизмы генетической регуляции, а также пространственная структура ферментов, трансформирующих нитрилы.

## ХАРАКТЕРИСТИКА НИТРИЛГИДРОЛИЗУЮЩИХ ФЕРМЕНТОВ

В настоящее время у микроорганизмов идентифицировано два типа нитрилгидратаз, различающихся простетическими группами (ионы железа или кобальта). Железосодержащие нитрилгидратазы встречаются чаще и были описаны первыми. Ионы кобальта обнаружены в нитрилгидратазах штаммов *R. rhodochrous* J1 (Kobayashi et al., 1992), M0, M8 (Астаурова и др., 1991, 1993), (Максимов и др., 2003), *P. putida* 5B (Payne et al., 1997) и *B. smithii* SC-J05-1 (Sugai et al., 1997).

Исследована структура нитрилгидратаз и нитрилаз, выделенных из различных микроорганизмов. Нативная четвертичная структура бактериальных нитрилгидратаз вариабельна. Их молекулярная масса варьируется от 30 до 520 кДа. За исключением гомотетрамерного фермента из *A. tumefaciens* d3 (Bauer et al., 1994), все остальные известные нитрилгидратазы являются  $\alpha\beta$ -гетеромультимерами (димерами, тетрамерами и т.д.), т.е. сложены из равного числа двух разных белковых цепей ( $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц) (см. рис. 1). Обе субъединицы необходимы для проявления активности фермента. Молекулярная масса  $\alpha$ -субъединицы составляет от 24 до 28 кДа,  $\beta$ -субъединицы – 25–39 кДа. Нитрилазы являются гомомультимерами с размером субъединиц 38–76 кДа и нативным составом от  $\alpha_2$  до  $\alpha_{16}$  (Banerjee et al., 2002).

У штамма *R. rhodochrous* J1 было об-

наружено образование двух видов нитрилгидратаз: высокомолекулярной (В-НГ), *Mr* 520 кДа, и низкомолекулярной (Н-НГ), *Mr* 130 кДа (Komeda et al., 1996). Низкомолекулярная нитрилгидратаза *R. rhodochrous* J1 имеет  $\alpha_2\beta_2$  нативную структуру белка, в отличие от  $\alpha_{10}\beta_{10}$  структуры высокомолекулярной нитрилгидратазы (Wada et al., 1998). Оба фермента являются кобальтзависимыми. Молекула  $\alpha\beta$ -гетеродимера содержит 1 атом кобальта, в отличие от железосодержащих нитрилгидратаз, где 1 атом железа приходится на каждую субъединицу фермента. Обнаружен новый тип нитрилгидратазы из *A. tumefaciens* B-261, содержащий и ионы кобальта, и ионы железа (Kobayashi et al., 1995). Описана нитрилгидратаза *Myrothecium verrucaria*, содержащая в активном центре ионы цинка (Maier-Greiner et al., 1991).

Выявлено структурное сходство аминокислотных последовательностей субъединиц бактериальных нитрилгидратаз. Аналогичные субъединицы В-НГ и Н-НГ *R. rhodochrous* J1 различаются между собой по аминокислотной последовательности (сходство  $\alpha$ -субъединиц составляет 53,5 %,  $\beta$  – 40,8 %), а также отличаются от соответствующих полипептидов железосодержащих нитрилгидратаз штаммов *R. rhodochrous* N-774, *P. chlororaphis* B23, *Rhodococcus* sp. R312. Сравнение N-концевых последова-



тельностью показало высокий уровень гомологии  $\beta$ -субъединиц при незначительном сходстве  $\alpha$ -субъединиц (Kobayashi, Shimizu, 1999).

Нитрилгидратазы в значительной степени различаются по физико-химическим свойствам и субстратной специфичности. Железосодержащие нитрилгидратазы гидратируют преимущественно алифатические короткоцепочечные нитрилы. Кобальтсодержащие ферменты имеют более широкий спектр субстратной специфичности и способны конвертировать также ароматические нитрилы. А. Miyanaga и соавт. предположили, что это связано с участием триптофана в образовании субстратно-ферментного комплекса кобальтсодержащих нитрилгидратаз. У железосодержащих ферментов он замещается на тирозин. Высокомолекулярная нитрилгидратаза *R. rhodochrous* J1 действует предпочтительно на алифатические нитрилы, тогда как низкомолекулярная нитрилгидратаза имеет более высокое сродство к ароматическим нитрилам. Нитрилгидратазы штаммов *B. smithii* SC-J05-1, *R. rhodochrous* J1, M8 и *C. nitrilophilus* ATCC21419 катализируют гидролиз как ароматических, так и алифатических нитрилов, но большинству присуща преимущественная селективность для определенных субстратов. Возможен и другой вариант: специфичность нитрилгидратазы к алифатическим нитрилам обусловлена не низким сродством фермента к ароматическим нитрилам, а тем, что последние действуют более как высокоаффинные ингибиторы, чем как субстраты. Так, бензонитрил и ряд других нитрилов и цианидов легко ингибируют нитрилгидратазную активность. Например, нитрилгидратазы *Rhodococcus* sp. R312, *C. pseudodiphtheriticum* ZBB-41 и *C. nitrilophilus* ATCC21419 ингибировались изобутиронитрилом, цианидом и  $\alpha$ -гидроксинитрилами соответственно. R. Cramp и соавт. сообщили о необратимом ингибировании бензонитрилом нитрилгидратазной активности *B. pallidus*

Dac521 (Cramp, Cowan, 1999).

В настоящее время бактериальные нитрилгидратазы условно принято разделять на мезо- и термофильные по температурному оптимуму фермента, хотя такое деление прежде всего относится к микроорганизмам, продуцирующим эти ферменты. Как правило, очищенные ферменты показывают значительную стабильность при температурах, близких к оптимальной температуре роста штамма – источника фермента. Термостабильность нитрилметаболизирующих ферментов, полученных из термофилов, существенно выше той, которая наблюдается у аналогов из мезофильных микроорганизмов. В настоящее время известны нитрилгидролизующие умеренные термофилы видов *Bacillus* и термофильные актиномицеты *P. thermophila* JCM3095.

Многие нитрилгидратазы являются относительно нестабильными, обладая коротким периодом «полужизни» активности при температуре роста в пределах 20–35°C: *C. pseudodiphtheriticum* ZBB-41,  $t_{1/2}$ =65 мин при 20°C; *P. chlororaphis* B23,  $t_{1/2}$ =11 мин при 30°C; *Corynebacterium* sp. C5  $t_{1/2}$ =7,5 мин при 45°C. Нитрилгидратазы *P. chlororaphis* B23, *R. rhodochrous* J1 и *Corynebacterium* sp. C5 стабилизируются в присутствии алифатических кислот (бутирата или валерата). В то же время активность нитрилгидратазы *B. pallidus* Dac521 снижалась при 30°C в два раза только через 7 ч. Высокой термостабильностью обладает кобальтзависимая нитрилгидратаза из мезофильной бактерии *R. rhodochrous* J1:  $t_{1/2}$ =58 мин при 60°C. В целом, кобальтсодержащие нитрилгидратазы обычно более термостабильны, чем железосодержащие ферменты. рН-оптимум большинства нитрилгидратаз находится в области нейтральных и слабощелочных значений. В то же время кобальтсодержащая нитрилгидратаза, выделенная из термофильной *B. smithii* SC-J05-1, имеет наибольшую активность при рН более 10,0.

## РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ

Известно, что состав ростовой среды может существенно влиять на уровень гидролитической активности. Источник азота, используемый для роста микроорганизмов, является одним из наиболее важных факторов, определяющих активность фермента. Влияние аммония на активность ферментов биodeградации нитрилов изучено у штаммов *R. rhodochrous* M0 и M8 *R. ruber* gt1. Показано, что нитрилгидратаза и амидаза штамма *R. rhodochrous* M0 коиндуцируются рядом алифатических нитрилов и амидов, а избыток аммония подавляет эту индукцию. Введение аммония в среду роста *R. rhodochrous* M8 вызывает координированное изменение активности ферментов его ассимиляции (глутаминсинтетаза, глутаматдегидрогеназа, глутаматсинтетаза) и ферментов утилизации нитрилов. Подавление аммонием активности глутаминсинтетазы и индукция глутаматдегидрогеназы происходили одновременно со снижением активности нитрилгидратазы и амидазы. Изменение активности ферментов является следствием азотного контроля биосинтеза на уровне транскрипции, что было подтверждено в опытах со штаммами, дефектными по глутаминсинтетазе.

Большинство индуцибельных ферментов обычно подвержены катаболитной репрессии легкометаболизируемыми источниками углерода. Глюкоза, фруктоза и сукцинат подавляют индуцированную амидами активность нитрилгидратазы и амидазы *R. rhodochrous* M0. Подавление глюкозой активности ферментов биodeградации нитрилов у данного штамма связано с репрессией транскрипции, аналогично тому, как это описано для грамотрицательных микроорганизмов, у которых быстрый метаболизм легко усваиваемых углеводов подавляет утилизацию других источников углерода. Образование нитрилгидратазы у *P. chlororaphis* B23, *R. ruber* gt1 также значительно угнетается при добавлении в среду роста глюкозы. В то же время, клетки *A. tumefaciens* B-261, *Brevibacte-*

*rium imperialis* CBS 498-74, растущие на базальной среде, содержащей глюкозу, показали высокую активность фермента.

Индукцибельный характер синтеза ферментов биodeградации нитрилов продемонстрирован в ряде научных работ. Нитрилы или амиды увеличивали активность нитрилгидратазы штамма *R. rhodochrous* M0 в несколько раз. Нитрилгидратаза *P. chlororaphis* B23 индуцировалась не только различными алифатическими нитрилами, но и соответствующими амидами и кислотами. Нитрилгидратазная активность штамма *Rhodococcus* sp. CGMCC 0497 появлялась только при добавлении в ростовую среду ацетонитрила, бензамида или метакриламида. Высокомолекулярная нитрилгидратаза *R. rhodochrous* J1 индуцировалась амидами – продуктами реакции, но не нитрилами. Необычный механизм регуляции, при котором фермент индуцируется конечным продуктом, а не субстратом, был изучен на рекомбинантных клетках *Rhodococcus*, имевших регион размером 4,6 т.п.н., расположенный выше (up-stream) гена нитрилгидратазы, под контролем промотора кластера генов нитрилгидратазы-амидазы *R. rhodochrous* J1. Уровень ферментативной активности и количество мРНК нитрилгидратазы у *R. rhodochrous* J1 регулировался амидами на транскрипционном уровне. Опубликованы данные об индукции  $\epsilon$ -капролактамом нитрилгидратазы *A. tumefaciens* B-261, специфическая активность которой при добавлении амида в ростовую среду увеличивалась в 13 тысяч раз. Подобное явление наблюдалось и у штамма *R. erythropolis* JCM2892: активность нитрилгидратазы, конвертирующей ароматические и гетероциклические нитрилы, увеличивалась при добавлении  $\epsilon$ -капролактама в культуральную среду.

Хорошим индуктором для ферментов метаболизма нитрилов является мочеви́на, которая не только служит источником азота для микроорганизмов, но и индуцирует активность нитрилгидратазы и ами-

дазы на транскрипционном уровне. В то же время мочевины незначительно повышала активность нитрилгидратазы *A. tumefaciens* В-261, а на цельные клетки *Bacillus* sp. RARc8 оказывала ингибирующее действие.

Добавление ионов кобальта в среду культивирования бактерий *R. rhodochrous* J1 и *R. rhodochrous* M8 необходимо для проявления нитрилгидратазной активности и не может быть заменено внесением солей других металлов. Нитрилгидратаза *R. rhodochrous* J1 индуцируется ионами кобальта, который необходим для формирования активного центра белка, его вторичной структуры, стабилизации, и, соответственно, уровня активности фермента. Экспрессия обоих типов нитрилгидратаз (высокомолекулярной и низкомолекулярной) регулируется на транскрипционном уровне амида-

ми – продуктами реакции, но не ионами кобальта. Отрицательный регулятор экспрессии низкомолекулярной нитрилгидратазы NhlD имеет схожую последовательность с белками-репрессорами MerD, CadC и ArsR, которые подавляют транскрипцию структурных генов, ответственных за резистентность к тяжелым металлам. Репрессия, контролируемая этими тремя белками, ослабляется в присутствии  $Hg^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $AsO_3^{3-}$ . Возможно, что NhlD-репрессор утратил чувствительность к тяжелым металлам в процессе эволюции.

Транскрипция генов нитрилгидратазы *R. rhodochrous* M8 также зависит от присутствия ионов кобальта. Это редкий пример специфической регуляции внутриклеточных ферментов на уровне транскрипции ионами металла, являющегося простетической группой фермента.

## ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ФЕРМЕНТОВ ГИДРОЛИЗА НИТРИЛОВ

В штаммах почвенных бактерий обнаружены хромосомные гены нитрилгидратазы и амидазы, контролирующие гидролиз нитрилов до соответствующей кислоты и аммония. Клонированы и секвенированы гены нитрилгидратаз и амидаз *R. rhodochrous* N-774, *R. rhodochrous* J1, *R. rhodochrous* M8, *R. erythropolis* и др. Установлено, что структурные гены  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц нитрилгидратаз располагаются смежно, однако порядок их кодирующих последовательностей различается. В каждом из генов низкомолекулярной и высокомолекулярной нитрилгидратаз *R. rhodochrous* J1 кодирующая последовательность  $\beta$ -субъединицы локализована выше гена  $\alpha$ -субъединицы, в отличие от нитрилгидратазных генов *R. rhodochrous* N-774, *P. chlororaphis* B23.

Амидазные гены находятся в такой же ориентации, но выше генов, кодирующих нитрилгидратазы *R. rhodochrous* N-774 и *P. chlororaphis* B23. У *R. rhodochrous* J1 амидазный ген находится на 1,9 т.п.н. ниже (downstream) гена, кодирующего  $\alpha$ -субъединицу низкомолекулярной нитрилгидратазы. Близкая локализация нит-

рилгидратазного и амидазного генов подтверждает теорию, что эти ферменты тесно связаны в двухступенчатой реакции деградации нитрилов.

Клонированы гены высоко- и низкомолекулярной нитрилгидратаз *R. rhodochrous* J1 в *E. coli* под контролем *lac*-промотора. При этом обнаружено, что уровень активности фермента в свободном клеточном экстракте *E. coli* был значительно ниже, чем у донора. Нитрилгидратазная активность не проявлялась, когда фрагмент ДНК в составе 2070 пар оснований, кодирующий оба фермента биодegradации нитрилов – нитрилгидратазу и амидазу, был клонирован в *E. coli*. При клонировании в *E. coli* фрагмента ДНК, содержащего гены нитрилгидратазы *P. putida* 5В, активность фермента в клетках трансформантов была в 6 раз выше, чем у штамма-донора.

Дальнейшие исследования показали, что для эффективной продукции фермента необходимы два региона ДНК, расположенных выше и ниже локуса, кодирующего гены субъединиц. Сделано предположение, что эти последователь-

ности могут кодировать белки, необходимые для включения ионов металла в структуру нитрилгидратазы, а также выступать в роли сенсорных белков, чувствительным к амидам, необходимым для индукции фермента.

Структурная организация генов высоко- и низкомолекулярной нитрилгидратазы *R. rhodochrous* J1 отличается от уже описанных генов нитрилгидратаз. Охарактеризованы пять открытых рамок считывания, которые примыкают к гену высокомолекулярной нитрилгидратазы, и две открытые рамки считывания, расположенные выше гена низкомолекулярной нитрилгидратазы.

Обнаружено, что регион размером 4,6 т.п.н., расположенный выше гена, кодирующего высокомолекулярную нитрилгидратазу у *R. rhodochrous* J1, необходим для экспрессии гена этого фермента в рекомбинантных клетках родококков с системой хозяин-вектор.

Охарактеризован генный кластер, включающий *nhlBA* гены, кодирующие низкомолекулярную нитрилгидратазу *R. rhodochrous* J1. Область размером

3,5 т.п.н., расположенная выше региона *nhlBA*, кодирующего кобальтсодержащий фермент, необходима для амидозависимой экспрессии *NhlBA* в трансформантах *Rhodococcus*.

Предложена схема организации и регуляции экспрессии генов, кодирующих ферменты, участвующие в утилизации нитрилов у *R. rhodochrous* M8. Следуя этой модели, гены нитрилгидратазы и амидазы штамма *R. rhodochrous* M8 объединены в регулон, контролируемый одним общим регуляторным геном. Этот регулон является объектом азотной и углеродной катаболитной репрессии. С- и N-сигналы распознаются в регионе промотора регуляторного гена, а цели этих сигналов расположены в регионах промоторов каждого из генов – нитрилгидратазы и амидазы. Таким образом, гены нитрилгидратазы и амидазы большинства описанных штаммов, как правило, тесно сцеплены и, по-видимому, организованы как оперон. Гены метаболизма нитрилов у штамма *R. rhodochrous* M8 составляют регулон.

## ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПРОДУЦЕНТОВ НИТРИЛГИДРАТАЗЫ

В настоящее время существует несколько направлений применения способности бактерий к трансформации нитрилов.

Самым весомым результатом исследований метаболизма нитрилов стало применение продуцентов нитрилгидратаз в крупнотоннажном промышленном производстве акриламида. Полимеры и сополимеры акриламида необходимы для многих отраслей промышленности, а также для очистки питьевой воды и промышленных стоков. На смену энергоемким способам химического синтеза этого соединения приходит одностадийный экологичный биотехнологический процесс с применением продуцентов нитрилгидратазы *P. chlororaphis* B23, *Rhodococcus* sp. N-774, *Rhodococcus* sp. R-312, *R. rhodochrous* J1 (Kobayashi et al., 1992), *R. rhodochrous* M8 (Астаурова и др.,

1993), *R. erythropolis* E84 (Демаков и др., патент РФ № 2196822), *R. ruber* (Демаков и др., патент РФ № 2223316) в производстве акриламида является первым успешным опытом применения биокаталитических технологий для крупнотоннажного органического синтеза (Hughes et al., 1998). В настоящее время компания «Митсубиши» (Токио, Япония) производит более 30000 тонн акриламида в год с использованием биокатализатора третьего поколения на основе штамма *R. rhodochrous* J1. Данный штамм разработан для коммерческого применения компанией «Нитто» в сотрудничестве с учеными из университета Киото (Kobayashi et al., 1992). Этой же компанией на основе штамма *Pseudomonas chlororaphis* B23 был получен биокатализатор для производства 5-циановалерамида, который является исходным соединением для синте-

за нового гербицида азафенидина («Дюпон»). Перспективными для внедрения в промышленное производство являются биокаталитические способы получения никотинамида и никотиновой кислоты из 3-цианопиридина.

Увеличивается интерес к регио- и стереоселективной биотрансформации нитрилов. Доказана способность иммобилизованных клеток *Rhodococcus* к региоселективному гидролизу ароматических динитрилов (рис. 4). Способность к регио- и стереоспецифической биотрансформации алифатических, динитрилов и ароматических нитрилов показана у *Rhodococcus* sp. AJ270 (Wang et al., 1999). Нитрилгидратаза, продуцируемая *P. putida* 5B, способна к стереоселективному гидролизу 2-(4-хлорофенил)-3-метилбутиронитрила в соответствующий (S)-амид с выходом около 90 % (Fallon et al., 1997). Фермент *A. tumefaciens* d3 конвертирует 2-фенилбутиронитрил и кетопрофен нитрил в соответствующие (S)-амиды с выходом энантиомеров более 90 % при 30 %-ной конверсии этих субстратов (Layh et al., 1997).

Известно, что 2-арилпропионовая кислота и ее производные представляют со-

бой важный класс противовоспалительных средств. Ее физиологическая активность ограничена S-изомерами. Нитрильная и нитрилгидратазно-амидазная системы микроорганизмов могут быть использованы для получения оптически чистой (S)-2-арилпропионовой кислоты (Bunch, 1998). Нитрилгидратаза *R. rhodochrous* NCIMB 11216 гидратирует нитрильные группы гранулярных полиакрилонитрилов (ПАН40 и ПАН190) и акриловых волокон (Tauber et al., 2000). Такая ферментативная модификация находится в фокусе интересов текстильной промышленности.

В последнее время усиливается интерес к нитрилгидратазам термофильных микроорганизмов, показывающим высокую стабильность, широкую субстратную специфичность и скорость оборота нитрил-метаболизирующих ферментов даже при субоптимальных температурах (Banerjee, 2002).

Одной из первых областей приложения биологической трансформации нитрилов явилась биологическая очистка промышленных, сельскохозяйственных стоков и почв, загрязненных нитрилами. При разработке биологического процесса



Рис. 4. Биокаталитическим путем могут быть получены различные лекарственные препараты

очистки почв от загрязнений в 1981 г. профессор Арай с соавт. выделил из промышленных стоков с акриламидом *Rhodococcus* sp. 10 021R, который трансформировал акриламид до диоксида углерода и аммония.

Поскольку нитрильные соединения относятся к одной из наиболее токсичных групп поллютантов, остро стоит проблема контроля за их содержанием в сточных водах и других объектах окружающей среды. Современные методы анализа этих веществ, обладая высокой чувствительностью и селективностью, требуют дорогостоящего оборудования и его высококвалифицированного обслуживания, длительной и сложной подготовки проб, что не позволяет использовать их для мониторинга и экспрессного анализа *in situ*. Поэтому перспективной областью применения бактерий, способных к трансформации нитрилов и амидов, становятся биосенсорные системы контроля загрязнения окружающей среды, так как эти вещества относятся к одной из наиболее токсичных групп поллютантов. Так, количественное определение бензонитрила в водных растворах проводилось с помощью фермента бензонитрилазы, выделенного из бактериальных клеток *Rhodococcus* sp. (Liu et al., 1993)). Показана возможность использования респираторной активности клеток *R. rhodochrous* M8, обладающих нитрилгидратазно-амидазной ферментативной системой, для количественного определения ацетонитрила, акрилонитрила и акриловой кислоты в водных растворах (Рогачева, Игнатов, 2001).

Перспективным направлением биотехнологии является разработка эффективных методов иммобилизации каталитически активных клеток и применение биокатализаторов на основе иммобилизованной биомассы. В частности, получены биокатализаторы для конверсии нитрилов карбоновых кислот на основе иммобилизованных клеток *P. chlororaphis* B23, *Brevibacterium* sp. CH1, *Bacillus* sp. BR449 и *R. rhodochrous* J1 (Fager, 1999; Graham et al., 2000).

(*E*)-2-метилбут-2-еновая кислота (тигликовая кислота) и (*Z*)-2-метилбут-2-

еновая (ангеликовая) кислота известны как исходный материал для получения ароматизаторов и вкусовых добавок, а также фармацевтических интермедиатов. Нитрилаза *Acidovorax facilis* 72W катализирует региоселективный гидролиз (*E/Z*)-2-метилбут-2-еннитрил до (*E*)-2-метилбут-2-еновой кислоты с незначительным количеством остаточного (*Z*)-2-метилбут-2-еннитрила. Водный раствор кислоты в виде соли аммония быстро отделяется от (*Z*)-2-метилбут-2-еннитрила и получается продукт с высоким выходом и чистотой. Биэнзиматический метод с комбинацией нитрилгидратазно-амидазной активности нескольких штаммов *Comamonas testosteroni* был также высоко региоселективен для получения (*E*)-2-метилбут-2-еновой кислоты из (*E/Z*)-2-метилбут-2-еннитрила.

Региоселективная алифатическая нитрилаза из *Acidovorax facilis* 72W была очищена и охарактеризована, соответствующий ген клонировали и секвенировали. Была достигнута сверх-экспрессия этого нитрилазного гена в *Escherichia coli*, таким образом, был получен микроорганизм, способный эффективно и региоселективно катализировать трансформацию алифатических динитрилов в цианокарбоновые кислоты. Полученный высокий выход, мягкие условия проведения реакции и устойчивость (стабильность) катализатора позволяют применять этот биокатализатор для промышленных целей. Компания «Дюпон» разработала биокаталитический процесс на основе штамма *Acidovorax facilis* 72W для трансформации 2-метилглутаронитрила в 1,5-диметил-2-пиперидон, который применяется в производстве электроники, специальных покрытий, а также в качестве растворителя.

Компания «Лонза» производит никотинамид (витамин В<sub>3</sub>) путем гидратации 3-цианопиридина с помощью иммобилизованных клеток *R. rhodochrous* J1. Объем производства достигает 3400 т/год.

Одна из ведущих компаний в химической отрасли, «Циба», в сотрудничестве с Биотехнологическим Центром Хаддерсфилдского Университета (Великобрита-

ния) на протяжении 10 лет проводила исследования в области ферментативного гидролиза акрилонитрила, которые завершились пилотным синтезом акрилата аммония.

По сравнению с традиционными химическими процессами синтеза, биокаталитический процесс позволил устранить этап удаления непрореагировавших субстратов, тем самым существенно снизив затраты на обезвреживание и удаление побочных продуктов, отходов и сточных вод. Целевой продукт, получаемый путем биологической трансформации, характеризуется более высокой степенью чистоты и, следовательно, более высоким качеством, чем при обычном химическом синтезе.

В настоящее время пристальное внимание ученых всего мира к микробной трансформации нитрилов объясняется не столько дефицитом промышленных биокатализаторов, сколько необходимостью получения продуцентов с улучшенными технологическими характеристиками и высокой стабильностью фермента.

Другим, не менее сильным, стимулом исследований процессов бактериальной трансформации нитрилов явилась возможность синтезировать с помощью бактериальных клеток биологически активные соединения с высоколабильными функциональными группами, которые практически невозможно получить обычными химическими способами, а также необходимость проведения регио- и стереоселективных трансформаций нитрилов для синтеза фармакологических препаратов.

Одна из перспективных сфер применения нитрилгидролизующих организмов – трансформация  $\alpha$ -гидроксинитрилов с получением хиральных  $\alpha$ -гидроксиамиды и  $\alpha$ -гидроксикарбоновых кислот, таких как замещенные миндальные кислоты – перспективных продуктов для фармацевтической и парфюмерной промышленности (Layh, 1992).

Нитрилазы используются и для производства активных энантиомеров, таких как (*R*)-миндальная кислота, (*R*)-3-хлорминдальная кислота, *S*-фенилмолочная

кислота и (*R*)-3-гидрокси-4-цианобутановая (масляная) кислота, важный интермедиат в синтезе холестерин-понижающего средства «atorvastatin calcium» (Lipitor).

Мягкий и селективный гидролиз широкого ряда нитрилов, ведущий к образованию карбоновых кислот, был достигнут при нейтральных условиях с помощью иммобилизованного и генетически модифицированного фермента, приготовленного из *Alcaligenes faecalis* ATCC8750. Эта иммобилизованная нитрилаза стала эффективным катализатором для стереоселективного гидролиза манделонитрила (нитрила миндальной кислоты) в (–)-(*R*)-миндальную кислоту. Данный метод практически полезен для продукции (получения) гидрокси-аналогов производных метионина для корма крупного рогатого скота и для трансформации соединений, содержащих другие кислото- или щелочечувствительные группы (Yamamoto et al., 1992). (–)-(*R*)-миндальная кислота является хиральным строительным блоком для получения средств против ожирения, противоопухолевых агентов, пенициллинов, полусинтетических цефалоспоринов и др., а также используется как агент, расщепляющий хиральные соединения (рацематы). Компания «БАСФ» успешно провела пилотный синтез *R*-миндальной кислоты из соответствующего нитрила.

Известно, что 2-арилпропионовая кислота и ее производные представляют собой важный класс нестероидных противовоспалительных средств. Ее биологическая активность ограничивается *S*-изомерами. Продемонстрирована возможность использования нитрилазной и нитрилгидратазно-амидазной систем микроорганизмов для получения оптически чистой (*S*)-2-арилпропионовой кислоты и других арилпроизводных соединений. Штамм *Acinetobacter* sp. AK226 способен трансформировать рацемический 2-(4'-изобутилфенил)пропионитрил в 2-(4-изобутилфенил)пропионовую кислоту (*S*-(+)-ибупрофен (Yamamoto et al., 1991).

Новый штамм *Rhodococcus* sp. AJ270, являющийся активным микроорганизмом-деструктором нитрилов, позволяет проводить регио- и стереоспецифическую

трансформацию алифатических динитрилов и ароматических нитрилов, в т.ч.  $\alpha$ -замещенных фенилацетонитрилов и амидов. Это помогает реализовать удобный и эффективный синтез некоторых энантиоочищенных  $\alpha$ -арилалкановых кислот и их производных, представляющих ценность для фармакологии (Wang, Lu, Ji, 2000). Китайскими учеными разработан также хемоэнзиматический процесс синтеза потенциального спазмолитика и антагониста ГАМК-рецепторов (*R*)-(-)-баклофена.

Ферментативный гидролиз  $\beta$ -гидроксизамещенных нитрилов приводит к получению хиральных  $\beta$ -гидроксикислот и  $\beta$ -гидроксиамидов, которые являются предшественниками  $\beta$ -блокаторов и 1,3-аминоспиртов, промежуточных соединений для синтеза большого числа натуральных продуктов, антибиотиков и хиральных вспомогательных соединений. Например, Vanfi с соавт. сообщили о пользе монозащищенных  $\beta$ ,  $\gamma$ -дигидроксиэфиров в синтезе фармакологически важных  $\beta$ -лактамных антибиотиков. Компанией «Лонза» синтез (*S*)-2,2-диметилциклокарбоксамиды осуществляется с применением двухэтапной трансформации. Нитрил, получаемый химическим путем, гидролизуется в рацемический амид штаммом, содержащим нитрилгидратазу. Далее гидролиз нежелательных (*R*)-изомеров проводится амидазой. Получаемая (*R*)-2,2-диметилциклопропановая кислота трансформируется традиционными методами в рацемический нитрил, который используется повторно. (*S*)-амид используется в качестве исходного компонента для получения Циластатина, ингибитора  $\beta$ -лактамазы.

Важными фармацевтическими интермедиатами являются арилуксусные кислоты.  $\beta$ -аминокислоты обладают антибиотическими, фунгицидными, цитотоксическими и другими важными фармаколо-

гическими свойствами. Известным примером является (1*R*,2*S*)-3-фенилизосерин – основной компонент сильнодействующего противоопухолевого агента paclitaxel (Taxol®) и его аналогов (например, Taxotere®).  $\beta$ -аминокислоты являются ключевыми компонентами многих пептидов естественного (природного) происхождения. Они сами по себе также обладают фармакологическим действием, например, (1*R*,2*S*)-*cis*-аминоциклопентановая кислота (циспентадин) является противогрибковым антибиотиком.

Таким образом, скрининг природных штаммов микроорганизмов позволил обнаружить уникальные ферменты, способные к региоспецифичному и стереоселективному гидролизу нитрилов. Разработаны и с успехом применяются методы, предоставляющие возможность эффективно модифицировать природные штаммы и осуществить переход от биокаталитического синтеза микроколичеств высокоценных химических соединений к промышленным масштабам.

Однако до настоящего времени биотехнологический процесс не достиг широкого внедрения в промышленный синтез амидов и карбоновых кислот и является приоритетным направлением научных разработок. Ввиду того, что существует ограниченное количество промышленных процессов, использующих нитрилазу и нитрилгидратазно-амидазный комплекс ферментов, сохраняется огромный потенциал для их промышленного применения. В связи с этим многие известные химические компании, такие как «Диверса», «БАСФ», «Дюпон», «Доу Кэмикалс», «Циба», «Дегусса», «Лонза» и «ДСМ», проявляют интерес к биокаталитической трансформации нитрилов и стимулируют проведение исследований, направленных на создание эффективных биокатализаторов для тонкого химического синтеза.

## ИММОБИЛИЗОВАННЫЕ БИОКАТАЛИЗАТОРЫ

Технологические процессы, идущие с применением иммобилизованных клеток, известны давно. Опыт использования

микроорганизмов в промышленном производстве, накопленный более чем за столетний период, привел к необходимости



систематизации данных, осмысления закономерностей и к поиску возможностей интенсификации микробиологических производств. Это нашло отражение в неуклонном возрастании интереса к разработке процессов иммобилизации и функционирования иммобилизованных клеток, технологических схем на основе иммобилизованной биомассы с требуемой ферментативной активностью.

В производственном процессе иммобилизация клеток микроорганизмов была впервые применена более 150 лет назад. Однако бурное развитие методов иммобилизации живых клеток началось с 70-х гг. XX века, что связано с потребностями фундаментальных исследований в области биохимии, молекулярной биологии, физиологии микроорганизмов, а также с разработкой современных биотехнологических производств. В России в начале 70-х годов Г.К. Скрябин и К.А. Кощеенко совместно с другими сотрудниками Института биохимии и физиологии микроорганизмов АН СССР провели первые эксперименты по иммобилизации интактных клеток микроорганизмов. В 1975 г. на Советско-американской конференции Г.К. Скрябин выступил с докладом, в котором обосновал теоретические аспекты иммобилизации живых клеток микроорганизмов и возможности их практического использования, в том числе как биокатализаторов пролонгированного действия в синтезе стероидных гормонов. В начале 70-х годов группа исследователей из Японии под руководством I. Chibata сообщила об успешном проведении биосинтеза L-аспартата иммобилизованными клетками, содержащими аспартазу, после чего значительное количество исследовательских групп предприняло попытки проведения различных биосинтезов и трансформаций органических веществ иммобилизованными клетками микроорганизмов.

Проблема использования иммобилизованных клеток в промышленности и технологиях очистки окружающей среды приобретает все большую актуальность в наши дни.

Примеры использования иммобилизо-

ванных клеток микроорганизмов и ферментных препаратов разнообразны и затрагивают различные отрасли биотехнологии, в том числе производственные процессы пищевой, фармацевтической и химической промышленности, технологии очистки окружающей среды и аналитические методы определения химических соединений. По определению Я. Халгаша, иммобилизация биокатализаторов – это фиксирование ферментов или клеток в некоторой фазе, чаще всего нерастворимой, отделенной от другой фазы (раствора), в которой находятся молекулы субстрата или продукта, причем возможен перенос этих молекул между фазами.

Применение ферментов в качестве биокатализаторов ограничено вследствие их низкой стабильности и высокой стоимости чистых препаратов. Иммобилизация клеток микроорганизмов дает ряд преимуществ как перед свободными клетками, так и перед иммобилизованными ферментами. Живая клетка представляет собой готовый биохимический реактор, в котором реализуются не только процессы, приводящие к образованию конечного продукта, но и ряд других реакций, способствующих поддержанию каталитической активности системы на высоком уровне.

Иммобилизация клеток – это дополнительные затраты, как временные, так и материальные, следовательно, они должны возмещаться. Можно выделить следующие основные преимущества, которые появляются у иммобилизованных клеток перед интактными:

1. Упрощаются операции разделения биокатализатора и сред, содержащих целевые продукты, что почти всегда позволяет перейти от периодических схем к более производительным непрерывным технологиям.
2. Для непрерывных процессов появляется возможность более длительной эксплуатации клеток в отличие от однократного использования свободных культур.
3. До определенной степени повышается устойчивость клеток к действию не-

благоприятных инактивирующих внешних факторов (температуры, кислотности, концентрации электролитов или токсических веществ), а иногда становится возможной дополнительная защита культуры от патогенной для нее микрофлоры в случае нарушения стерильности.

4. Появляется возможность повышения продуктивности процессов в результате увеличения концентрации биомассы в единице рабочего объема реактора.

Подбирая метод иммобилизации, можно получить оптимальный биокатализатор для определенной реакции. Из-

вестные методы иммобилизации клеток можно разделить на три группы: связывание на твердом носителе; включение в пространственную структуру без образования связей и «сшивка» клеток между собой при помощи бифункциональных реагентов. Связывание на поверхности материала носителя подразделяется на адсорбцию и ковалентное присоединение. Среди методов пространственного фиксирования выделяют включение в структуру геля, микрокапсуляцию и иммобилизацию с использованием мембранной технологии.

### СВЯЗЫВАНИЕ КЛЕТОК МИКРООРГАНИЗМОВ НА ПОВЕРХНОСТИ НЕРАСТВОРИМОГО НОСИТЕЛЯ

Иммобилизация путем адсорбции – наиболее мягкий и предпочтительный для живых клеток способ фиксации по сравнению с включением в органические полимеры. Отмечается, что сорбционный метод иммобилизации микроорганизмов на различных носителях позволяет значительно повысить эффективность биокатализа и биодegradации.

Одной из областей применения иммобилизованных клеток является биологическая очистка сточных вод, биодеструкция поллютантов и ксенобиотиков. Иммобилизованные микроорганизмы повсеместно используются в очистных сооружениях. Активный ил, функционирующий в аэротенках, представляет собой скопление разнообразных микроорганизмов, адсорбированных на твердом носителе. Существуют промышленные методы использования активного ила, где иммобилизацию используют в «чистом» виде. В этом случае применяются биофильтры – проточные емкости, содержащие консорциум клеток активного ила, прикрепленных к поверхности носителя. Носителем в этом случае может быть керамика, щебень, гравий, песок, керамзит, стекловолокно, металлические полимерные материалы, компост, багасса и др.

Для биологической очистки стоков химических предприятий применяется колонизация гранулированных активных

углей бактериями, разлагающими различные химические соединения. Однако данные носители в биореакторах очистки сточных вод подвержены изнашиванию – до 5 % в год, что сопровождается образованием значительного количества суспендированных твердых частиц в вытекающих водах. Более того, затруднено механическое удаление избытков биомассы. Для ликвидации этих недостатков при сохранении скорости биодegradации был разработан нейлоновый крупнопористый носитель, размеры пор которого находятся в пределах от 100 до 1200 мкм.

Для иммобилизации микроорганизмов-деструкторов также могут использоваться пористые керамические материалы. Как отмечают M. Martin et al., жизнеспособность клеток *Pseudomonas* sp. оставалась достаточно высокой при иммобилизации на гранулярном керамическом носителе, при этом значительно увеличивалась их способность разлагать гербицид пропахлор. Иммобилизованная таким способом биомасса может быть использована для очистки от органохлоридов больших объемов сточных вод.

Путем адсорбирования может повышаться толерантность бактерий к различным органическим соединениям. Так, фенол в сублетальных концентрациях в меньшей степени ингибирует иммобилизованные микроорганизмы, чем свобод-

ные. Имобилизованные клетки бактерий устойчивы к высоким концентрациям нафталина и быстрее метаболизируют его, чем свободные клетки. S. Manohar et al. изучали способность штамма *Pseudomonas* sp., адсорбированного на различных носителях, утилизировать нафталин. По сравнению с иммобилизацией включением в структуру гелей альгината, агара и полиакриламида, адсорбированные на полиуретановых пленках клетки дольше проявляли каталитическую активность и были способны выдержать больше циклов реакции, в результате чего достигалась более эффективная деградация нафталина.

Для иммобилизации клеток микроорганизмов могут быть использованы адсорбенты органической (хитин, древесина, целлюлоза и т.д.) либо неорганической (глины, песок, кремнеземы, угли и т.д.) природы, искусственные неорганические носители (углеродные материалы, металлические сплавы, керамика и т.д.) и синтетические полимеры (полиэтилен, нейлон, полиуретаны и т.д.). Как адсорбенты могут использоваться целлюлозные пленки, пористое стекло и хитозановые шарики, в частности на этих носителях были адсорбированы клетки клостридий. Причем иммобилизация клостридий на целлюлозных пленках более эффективна для продукции олигосахаридов из полисахаридов, чем на пористом стекле и хитозане.

Для иммобилизации целых клеток могут использоваться глиняные и диатомовые гранулы. Перспективными носителями являются пористые углеродные материалы, в частности активные угли. Атомы углерода на поверхности кристаллов находятся в ином электронном и энергетическом состоянии, чем атомы объемной фазы, особенно в местах дефектов кристаллической решетки. Наличие у таких атомов свободных валентностей облегчает их химическое и сорбционное взаимодействие с различными веществами. Угольные материалы обладают высокой химической и биологической стойкостью, механической прочностью, достаточной проницаемостью для фермента и субстра-

тов, большой удельной поверхностью (1000 м<sup>2</sup>/г и более), возможностью получения форм, удобных в технологическом отношении (гранул, тканей, волокон). Иммобилизацию биопрепаратов на угольных материалах проводят либо адсорбцией, либо химическим связыванием с использованием бифункциональных реагентов. В исследованиях по иммобилизации клеток микроорганизмов на угольных носителях можно выделить несколько направлений:

- 1) создание биореакторов на основе иммобилизованных клеток для проведения процессов биосинтеза различных соединений;
- 2) осуществление биodeградации органических веществ в сточных водах и формирование биофильтров для улавливания газов;
- 3) улучшение свойств природных ископаемых;
- 4) применение в медицине для прочной сорбции патогенных микроорганизмов.

Г.А. Коваленко с соавт. были разработаны неорганические углеродсодержащие носители для создания высокостабильных гетерогенных биокатализаторов. Макроструктурированные керамические носители, покрытые слоем каталитического волокнистого углерода и графитоподобным углеродом, успешно применялись для иммобилизации как растущих, так и нерастущих бактериальных и дрожжевых клеток. Авторы отметили, что носители со слоем каталитического волокнистого углерода обеспечивают прочное связывание микробных клеток, а также полное сохранение ферментативной активности микроорганизмов и максимальную стабилизацию полученных биокатализаторов.

Ковалентная модификация носителя, впервые опробованная для иммобилизации ферментов, может быть использована также и при связывании целых клеток. Ковалентные взаимодействия происходят между реакционно-способными карбоксильными и аминок группами на поверхности клетки и бифункциональным агентом, обеспечивающим поперечную сшивку. В

качестве сшивающего агента часто используются глутаральдегид, хлориды хрома и титана, карбодиимид.

Целые клетки могут быть также иммобилизованы металлохелатным методом. Этот метод основан на хелатирующих свойствах переходных металлов, в частности титана (IV), циркония (IV) и дру-

гих, которые особенно привлекательны из-за нетоксичности их оксидов. Так, Л.И. Сапунова с соавт. отмечают повышение стабильности, а также термо- и рН-оптимумов действия ксилозо(глюкозо)изомеразы *Arthrobacter* sp. при связывании целых клеток гидроокисью кобальта.

## ВКЛЮЧЕНИЕ КЛЕТОК МИКРООРГАНИЗМОВ В СТРУКТУРУ НОСИТЕЛЯ

Иммобилизация микроорганизмов включением в структуру гелей позволяет достичь высокой плотности клеток в биореакторе, что увеличивает продуктивность биотехнологических процессов. Кроме того, микробные клетки, иммобилизованные в матриксе гидрогеля, в определенной степени защищены от неблагоприятных воздействий окружающей среды, таких как изменения рН и температуры, от воздействия органических растворителей и токсичных соединений в высокой концентрации, а также от атаки чужеродной микрофлоры.

В данном варианте иммобилизации микроорганизмов в качестве носителей применяются полимерный гель, полимерная пленка либо полимерное волокно. Нерастворимые материалы, которые служат основой для матриц подобных носителей, могут быть как органическими веществами, так и неорганическими соединениями, как синтетическими производными, так и природными продуктами.

Гелевый матрикс для иммобилизации микробных клеток может состоять из агара, агарозы, к-каррагинана, желатины, коллагена, альгината, хитозана, целлюлозы, полиакриламида, полиуретана, поливинилового спирта. Данный тип иммобилизации обладает определенными недостатками: гель с включенными в него клетками может быть механически непрочным, кроме того, на клетки оказывают влияние диффузионные ограничения. Клетки, иммобилизованные в крупных гранулах геля, делятся только на периферии гранулы из-за недостаточной диффузии субстрата и кислорода в центр гранулы. Максимум клеточной нагрузки при

включении в гель ограничивается 25 % от общего объема из-за слабой механической прочности образуемых гранул. Тем не менее, данный тип иммобилизации широко представлен в научной литературе и используется в биотехнологическом производстве.

Подсчитано, что в конце 80-х годов в мировой практике ферментационных процессов более 50 % методов иммобилизации относилось к включению в структуру геля и только 20 % – к адсорбции. Для пищевой микробиологической промышленности оптимальным носителем был признан альгинат. Сравнительный анализ показал, что иммобилизованные в геле альгината этанол-продуцирующие микроорганизмы более продуктивны и функционируют более длительно, чем свободный биокатализатор. Что касается технологий очистки окружающей среды, то природные гели в качестве носителей практически не используются в установках очистки стоков, по масштабам превышающих пилотный уровень, хотя кальций-альгинатный гель получает широкое распространение в качестве носителей штаммов-деструкторов.

Включение клеток микроорганизмов в к-каррагинан может быть использовано и для целей биотехнологического производства. Каррагинан широко применяется для иммобилизации микроорганизмов, однако при его использовании активность биокатализатора по сравнению с интактными клетками снижается более чем наполовину.

Включение в гель альгината в настоящее время является одним из наиболее распространенных способов иммобилиза-

ции целых клеток и признается наиболее эффективным методом. В качестве катионов, замещающих натрий в соли альгиновой кислоты, могут быть использованы  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$ .

В альгинат бария были включены целые клетки *Candida guilliermondii* ССТ 7207, способные к конверсии нитрилов, в альгинат кальция – клетки термофильной *Bacillus* sp., трансформирующей алифатические нитрилы, циклические нитрилы и динитрилы. Имобилизованные дрожжевые клетки, в отличие от интактных, были способны разлагать такие токсичные для клеток нитрилы, как бензонитрил, циклопентанокарбонитрил и бензамид. Включение в структуру геля термофильных бацилл в некоторой степени обеспечивало дополнительную термостабильность нитрилгидратазы и возможность повторного использования биокатализатора, но при этом для имобилизованных клеток наблюдалось снижение скорости утилизации нитрилов из-за ограничения массообмена.

Также показано, что клетки *P. putida*, имобилизованные в геле альгината, более эффективно разлагают цианид натрия, чем интактные либо имобилизованные в агаре или каррагинане. В этом случае преимущество имобилизации проявляется главным образом в способности имобилизованных клеток выдерживать высокие концентрации токсичных поллютантов в процессе очистки сточных вод. Однако авторы отмечают и потенциальный недостаток этого вида имобилизации, заключающийся в ограничении доступности субстрата и кислорода для клеток, что лимитирует скорость реакции.

Как и для клеток *P. putida*, для разлагающих нитрилы клеток *C. guilliermondii* UFMG-Y65 была отмечена более эффективная конверсия ацетонитрила при использовании в качестве матрицы геля альгината, а не каррагинана или пектина. Имобилизация в альгинатном геле клеток *P. clororaphis* B23, содержащих нитрилгидратазу и гидролизующих адипонитрил до 5-циановалерамида, также была признана наиболее эффективной.

Е.С. Hann et al. сравнили различные способы имобилизации нитрилгидролизующих бактерий и отвергли включение клеток в гели агарозы и каррагинана из-за быстрой инактивации нитрилгидратазы в результате воздействия повышенной температуры (35–50°C), необходимой для имобилизации. Катализатор, имобилизованный в полиакриламидном геле, был менее стабильным и производил меньше продукта на единицу массы катализатора, чем в матрице альгинатного геля. Отмечено, что культивирование имобилизованных в альгинате клеток *Rhodococcus equi* No 23 более продуктивно в отношении получения холестеролоксидазы, чем культивирование свободных клеток. D. Brady et al. отмечали стабилизацию  $\beta$ -галактозидазной активности клеток *Kluveromyces marxianus* imb3, включенных в структуру альгината кальция. Кроме того, гранулы альгината кальция могут быть стабилизированы поперечной сшивкой карбоксильных групп альгината с синтетическими полимерами, такими как поливиниловый спирт и полиакриламид, либо обработаны полиэтиленмином с последующей поперечной сшивкой. Подобные модификации альгината приводят к повышению операционной стабильности биокатализаторов.

Включение клеток в агар также применяется исследователями в научных и практических целях:

- 1) агар – классический микробиологический материал, хорошо совместимый с микробными популяциями и используемый для культивирования микроорганизмов;
- 2) структурные элементы агара родственны веществам, составляющим защитные покровы микробных клеток;
- 3) агар проявляет высокие защитные свойства по отношению к микробным клеткам в неблагоприятных условиях.

Агар может использоваться в качестве носителя-ксеропротектора при длительном хранении биомассы. Кроме того, агаровый матрикс пригоден для имобилизации клеток и в промышленных биокаталитических процессах. Так, обладающие амидазной активностью бактерии

*Rhodococcus* sp. AJ270, включенные в агаровый матрикс, проявляли в 8 раз большую активность на 1 см<sup>3</sup> матрикса, чем адсорбированные на ионообменной смоле Dowex 1. Но, с другой стороны, клетки *P. putida*, иммобилизованные в агаре, разлагали цианид с более низкой скоростью, чем включенные в структуру альгината, что может быть обусловлено уменьшением диффузии ионов цианида или кислорода в гранулы носителя. Иммобилизованные в агаре клетки *Pseudomonas* sp., способные к деструкции нафталина, обладали более низкой операционной стабильностью (12 циклов без потери активности), чем в альгинате (18 циклов), полиакриламиде (23 цикла) и на полиуретановой пленке (45 циклов). А.Е. Китова с соавт. отмечают, что, несмотря на преимущества агарового геля (отсутствие токсического действия на клетки, мягкие условия иммобилизации), включение в агар клеток *R. erythropolis* HL PM-1, деградирующих 2,4-динитрофенол, приводило к снижению активности. А.А. Макаренко с соавт. объясняют снижение максимального значения скорости деградации сульфоароматических соединений у

иммобилизованной в агаровом геле биомассы *Comamonas testosteroni* диффузионными ограничениями в гранулах геля.

Среди методов иммобилизации в матрикс поливинилового спирта (ПВС) можно выделить следующие: ковалентное связывание, адсорбцию, поперечную сшивку бифункциональными реагентами, облучение  $\gamma$ -лучами, фотосшивку, замораживание-оттаивание. Матрицей для иммобилизации клеток может служить ПВС, который при смешивании с фотoinициатором становится фоточувствительным полимером, образующим объемную решетку под воздействием ультрафиолета. Сферические гранулы ПВС могут быть получены методом накапывания полимера в раствор борной кислоты. Такие гранулы прочны и не теряют биологической активности. Этот метод также более экономичен по сравнению с включением в структуру гелей агара или акриламида. Из ПВС могут образовываться пленки, волокна, а в качестве модифицирующих добавок возможны альгинат и тетраборат натрия. Вместо токсичной борной кислоты сшивающим агентом может служить раствор нитрата натрия.

## ИММОБИЛИЗАЦИЯ КЛЕТОК МИКРООРГАНИЗМОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕМБРАННОЙ ТЕХНОЛОГИИ

При данном варианте иммобилизации распространению микроорганизмов по всему объему реактора препятствуют специальные полупроницаемые мембраны, локализирующие биомассу в определенной части системы. Именно поэтому микробиологические процессы в мембранных реакторах относят к процессам с использованием иммобилизованных клеток, хотя реальная фиксация микроорганизмов может отсутствовать. Применяются следующие системы: плоские мембраны, пористые полые волокна и микрокапсулы. В качестве плоских мембран применяются бактерицидные фильтры, не позволяющие микроорганизмам проникать в ту часть внешней среды, откуда производится отбор продуктов. Состояние микробных клеток в системах с использованием плоских мембранных носителей мало от-

личается от состояния свободно суспендированной биомассы, за исключением той небольшой части популяции, которая непосредственно контактирует с мембраной и может адсорбироваться на ее поверхности.

Полые волокна представляют собой длинные тонкие трубки, стенки которых выполнены из полимерной мембраны. Клетки обычно помещают снаружи волокон в пространство между волокном и стенкой реактора, а выделяемые микроорганизмами продукты выводят из реактора по внутренним каналам мембранного волокна.

К методам мембранной технологии также относится микрокапсулирование. Внешняя оболочка микросфер, в которую заключена биомасса, представляет собой тонкую, непроницаемую для клеток, но

проницаемую для растворимых веществ искусственную мембрану. Метод инкапсулирования используется с 1993 года как технология, альтернативная методу включения в гель. Преимущество этого метода по сравнению с включением в гель заключается в более высокой клеточной нагрузке и в отсутствии утечки иммобилизованных клеток. В реакторах, где применяются заключенные в микрокапсулы клетки, возможны очень высокие удельные концентрации биокатализатора, что в результате позволяет без потери производительности процесса значительно

уменьшить общий объем реактора. Мембрана капсулы также защищает иммобилизованные клетки от токсичной органической фазы и образует для клеток комфортную окружающую среду. Капсулы обладают механической прочностью и пригодны для длительного использования. Описаны четыре методики для инкапсуляции клеток: коацервация, межповерхностная полимеризация, двухстадийный метод растворения на стадии, предваряющей образование геля, и одностадийный метод образования жидких капель.

### БИОТРАНСФОРМАЦИЯ С УЧАСТИЕМ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ КЛЕТОК

В биокаталитических процессах, альтернативных химическим, преимущество использования иммобилизованных клеток отмечается во многих случаях. Так, возрастает выход гидроксированных углеводов с сохранением высокой энантиоселективности при использовании в качестве биокатализатора клеток *B. megaterium*, иммобилизованных в геле альгината кальция. Ферментативное восстановление органических нитросоединений с целью получения аминов, широко используемых в фармацевтическом и химическом производстве, с более высоким выходом может производиться иммобилизованным биокатализатором на основе клеток *E. coli*.

Биотрансформация стероидов иммобилизованными клетками является особой областью, привлекающей внимание исследователей. В ряде случаев при иммобилизации наблюдалось возрастание скоростей конверсии и увеличение времени функционирования биокатализатора. Так, иммобилизация клеток *Pseudomonas oleovorans* в гидрогеле поливинилпирролидона/полиэтиленоксида повышала образование преднизолона из гидрокортизона.

Биокатализ успешно применяется в области крупнотоннажного химического синтеза при производстве амидов, в частности акриламида, биомассой нитрилгидролизующих микроорганизмов. Наряду с

селекционной работой по получению высокоэффективных штаммов для улучшения характеристик биокатализатора необходим поиск подходящих носителей и методов для иммобилизации бактерий, обладающих нитрилгидратазной активностью.

Иммобилизация нитрилконвертирующих бактерий в целях биотрансформации и биоремедиации направлена на получение стабильного биокатализатора для долговременного использования. J. Hughes et al. обобщают опыт применения иммобилизованных клеток родококков в промышленном синтезе акриловых мономеров. Иммобилизованные в ПААГ клетки штамма *R. erythropolis*, обладающие нитрилгидратазной активностью, конвертировали 1,1 М акрилонитрил с потерей не более 50 % активности фермента в течение 6 часов. Штамм *R. ruber*, проявляющий нитрилазную активность, был устойчив к условиям полимеризации акриламидного геля. Иммобилизованный биокатализатор трансформировал 1,3 М акрилонитрил с сохранением 50 % активности фермента в течение 47 дней. Клетки штамма *R. rhodochrous*, включенные в ПААГ, гидролизовали 0,42 М акриламид до акрилата аммония в течение 8 дней с сохранением 50 % первоначальной активности. Для иммобилизации нитрилконвертирующих микроорганизмов авторы также предлагали включение в гидрогели

альгината кальция, альгината бария, пектина, к-каррагинана, ПВС, агара и агарозы. У некоторых из этих иммобилизованных биокатализаторов повышалась термостабильность и толерантность к токсическим химическим веществам. Целые клетки *B. pallidus*, иммобилизованные в альгинате кальция, были более устойчивы к высоким концентрациям 3-цианопиридина и никотиновой кислоты, чем свободные клетки. Клетки *Candida guilliermondii*, включенные в гранулы альгината кальция, могли метаболизировать субстраты, недоступные для свободных клеток, такие как циклопентанокарбонитрил, бензонитрил, бензамид. С другой стороны, отмечалось снижение каталитической активности при иммобилизации включе-

нием в гели, что объяснялось ограничением массопереноса и доступа кислорода к клеткам. Как известно, диффузионных затруднений можно избежать при иммобилизации целых клеток методом адсорбции. Предпринимались попытки адсорбционной иммобилизации нитрилгидролизующих микроорганизмов, в частности на кремнеземе и на активированных полисульфоновых мембранах. Однако при адсорбции без активации носителя клеточная нагрузка, ферментативная активность и операционная стабильность были более низкими. С другой стороны, показано положительное влияние адсорбционной иммобилизации на активных углях клеток родококков, приводящее к стабилизации их нитрилгидратазной активности.

## ФИЗИОЛОГИЯ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

Сложным и противоречивым является вопрос о физиологии иммобилизованных клеток. В научных статьях встречаются данные, указывающие на различия в свойствах свободных суспендированных и иммобилизованных клеток. Скорость роста бактерий разных видов может возрастать, снижаться либо не изменяться после иммобилизации, в зависимости от природы субстрата и возможности его сорбции на носителе. Так, скорость роста штамма *Klebsiella oxytoca*, адсорбированного на гранулярных активных углях, возрастает более чем в 10 раз при росте на глутамате, который адсорбируется на поверхности углей и не изменяется при росте на глюкозе, не адсорбирующейся на носителе. Показано, что высокодисперсные материалы оказывали стимулирующий эффект на рост бактерий. В частности, высокодисперсный диоксид кремния и его модифицированные формы, а также глинистые природные материалы палыгорскит, монтмориллонит и каолин в концентрации 10 г/л повышали выживаемость и интенсивность роста азотфиксирующих микроорганизмов в процессе гетерофазного культивирования. Также представляют интерес сведения, касающиеся повышения ферментативной активности иммобилизованных клеток. По

данным Г.А. Коваленко с соавт., у адсорбированных на углеродсодержащих носителях дрожжевых клеток наблюдалось повышение активации внутриклеточной инвертазы в 1,5–1,8 раза и возрастание оксигеназной активности у адсорбированных родококков в 3,7 раза по сравнению с суспендированными клетками. При изучении метаболической активности иммобилизованных дрожжей была выявлена активация энергетического метаболизма, а также возрастание количества как запасных питательных веществ (гликогена и трегалозы), так и структурных полисахаридов (глюкана и маннана) и сдвиг в сторону повышения содержания насыщенных жирных кислот.

Установлено, что такой показатель, как активность воды, является одним из основных факторов, воздействующих на иммобилизованные клетки. Так, клетки *Klebsiella aerogenes* компенсировали низкую активность воды в микроокружении повышенным синтезом осмотически активных соединений. В результате, иммобилизованные клетки образуют большее количество многоатомных спиртов, в том числе глицерина и маннита. Показано, что низкая активность воды приводит к более высокой концентрации NADPH в клетке, что стимулирует анаболические



реакции.

В свою очередь, результаты изучения экспрессии стресс-зависимых генов *HSP12* и *SSA3* подтвердили, что иммобилизованные клетки в основном находятся в менее стрессовых условиях, чем свободносuspendedированные, возможно, из-за защитных свойств микроокружения. В любом случае, иммобилизация оказывает большое влияние на свойства плазматической мембраны, что может стать причиной изменений в ряде транспортных систем.

Как уже отмечалось, перспективы применения иммобилизованных клеток широки и включают в себя проведение процессов биотрансформации различных соединений, осуществление биodeградации органических веществ и ксенобиотиков, а также биоэлектрокатализ. Биологически чувствительные элементы в биосенсорах могут быть представлены не только ферментами, иммобилизованными в виде тонких гомогенных биоактивных слоев на твердых носителях, но и целыми клетками. При формировании рецепторного элемента биосенсора используют различные методы иммобилизации микроорганизмов – включение в гели, синтетические мембраны, а также адгезию, химическое прикрепление клеток друг к другу или к носителю с помощью бифункциональных реагентов. В настоящее время разработаны биосенсоры на количественное определение акрилонитрила в водных растворах, основанные на кондуктометрическом определении заряженного акрилата аммония, образуемого из

незаряженного акрилонитрила иммобилизованными клетками *R. ruber* – продуцентами нитрилаз. Для определения цианидов в среде в качестве альтернативы ион-селективному цианидному электроду была разработана биосенсорная система, основанная на аммонийном электроде и ферменте цианидазе. Кроме иммобилизованного фермента, биосенсор на цианиды может содержать целые клетки *R. rhodochrous*, обладающие данной ферментативной активностью.

Несомненно, направление биотехнологии, связанное с иммобилизацией клеток, будет развиваться и впредь, расширяя возможности применения микроорганизмов в промышленном производстве и технологиях защиты окружающей среды.

Известно, что некоторые нитрильные соединения являются промежуточными продуктами метаболизма растений и ряда других организмов. По-видимому, с этим связано распространение в почве и водной среде микроорганизмов, главным образом прокариотических, активно утилизирующих нитрилы и амиды карбоновых кислот. В то же время сообщества бактерий очень чувствительны к токсическому действию нитрилов и некоторых амидов антропогенного происхождения (акриламид, бензамид) и их присутствие в среде может сильно изменять состав почвенной и водной микрофлоры. Поэтому представляет интерес изучение бактерий – активных деструкторов нитрилов и амидов, исследование метаболизма этих веществ у бактерий.

## СЕЛЕКЦИЯ И ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ШТАММОВ-ПРОДУЦЕНТОВ ФЕРМЕНТОВ ДЛЯ БИОКАТАЛИЗА

Основным направлением деятельности Лаборатории химического мутагенеза ИЭГМ УрО РАН является селекция микроорганизмов, способных трансформировать различные органические соединения, исследование ферментов биотрансформации, механизмов генетической и биохимической

регуляции активности систем метаболизма ксенобиотиков (рис.5). Установлено, что почвы естественной среды обладают не меньшим разнообразием нитрилконвертирующих бактерий, чем грунты, загрязненные акрилонитрилом.



Рис. 5. Получение новых биокатализаторов: от почвенных бактерий до промышленного синтеза

Среди штаммов-деструкторов нитрилов и эфиров, выделенных из почв Пермской области, обнаружены представители различных родов бактерий: *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Azomonas*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Microbacterium*, *Citreobacterium*, *Aureobacterium* и др.

Среди полученных культур выявлены продуценты термостабильных ферментов. В результате селекционной работы получены штаммы бактерий *Bacillus. mycoides* B5 (патент РФ № 2160778), *Rhodococcus ruber* GT (патент РФ № 2223316) и *Rhodococcus erythropolis* E84 (патент РФ № 2196822), проявляющие высокую нитрилгидратазную активность по акрилонитрилу (140–680 ммоль/г сух. веса клеток /мин), что сопоставимо с зарубежными аналогами (активность по патентной литературе – 100–400 ммоль/г/мин). Также селектированы культуры *Pseudomonas fluorescens* C-2, *Azotobacter* sp. K15-6, *Rhodococcus* sp. P1, обладающие высокой нитриллазной активностью, достигающей 20 ммоль/мг/мин, и *Rhodococcus* sp. E20, ПЗ-8, *Pseudomonas* sp. Б5-8, обладающие высокой карбоксиэстеразной активностью

(8 ммоль/мг/мин).

Исследованы физиолого-биохимические свойства выделенных штаммов микроорганизмов, оптимизированы среды культивирования и условия для достижения максимальной активности ферментов. Нитрилгидратазы, нитриллазы и эстеразы этих штаммов различались по субстратной специфичности по отношению к ряду алифатических и ароматических нитрилов (рис.6), уровню активности, термостабильности, оптимальным значениям pH. Высокий уровень активности этих ферментов выражен не постоянно, а подвержен индукции в определенных условиях.

Проведено сравнительное исследование влияния ряда факторов среды на активность нитрилгидратаз и рост бактерий *R. ruber* gt1 и *R. erythropolis* 84. При росте на органоминеральной среде максимальная нитрилгидратазная активность у штамма *R. ruber* gt1 наблюдалась в конце, а у *R. erythropolis* 84 – в середине логарифмической фазы. С начала стационарной фазы нитрилгидратазная активность снижалась пропорционально времени культивирования. Уровень нитрилгидратазной активности заметно возрастал по-

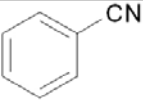
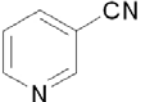
СУБСТРАТ	ФОРМУЛА	ОТНОСИТЕЛЬНАЯ НИТРИЛГИДРАТАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ, %*	
		<i>R. erythropolis</i> 84	<i>R. ruber</i> gt1
ацетонитрил	CH <sub>3</sub> CN	100	100
пропионитрил	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> CN	34,1	55,9
бутиронитрил	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CN	50,4	52,1
изобутиронитрил	CH <sub>3</sub> CH(CH <sub>3</sub> )CN	17,5	5,62
акрилонитрил	CH <sub>2</sub> CHCN	26,3	62
лактонитрил	CH <sub>3</sub> CH(OH)CN	6,3	5
адипонитрил	CN(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> CN	48,5	13
малондинитрил	CNCH <sub>2</sub> CN	8,3	11,71
бензонитрил		0,8	18,6
3-цианопиридин		1,6	10

Рис. 6. Способность нитрилгидратаз двух культур двух бактерий рода *Rhodococcus* трансформировать структурно-различные нитрилы (субстратная специфичность)

сле введения в среду нитрилов или амидов. Эффективно индуцировали фермент насыщенные алифатические нитрилы и амиды. При повышении содержания глюкозы в среде более 0,2 % экспрессия нитрилгидратазы существенно подавлялась. В то же время глюкоза не снижала нитрилгидратазную активность бесклеточных экстрактов штаммов *R. ruber* gt1 и *R. erythropolis* 84. Очевидно, что синтез фермента у них подвергается катаболической репрессии глюкозой, аналогично ранее обнаруженному эффекту у штаммов *Rhodococcus rhodochrous* M0 и M8.

Исследуемые штаммы были способны к росту на низкомолекулярных насыщенных алифатических нитрилах и амидах в качестве единственного источника азота и/или углерода. Но скорость роста и нитрилгидратазная активность в этом случае значительно ниже по сравнению с культурой, выращенной в присутствии аммония. Наибольшая активность нитрилгидратазы у *R. ruber* gt1 наблюдалась при концентрации аммония в среде 10 мМ в отсутствии других источников азота.

Известно, что амиды или мочевины необходимы для индукции и формирования четвертичной структуры нитрилгидратаз штаммов *Rhodococcus* sp. N744, *R. rhodochrous* J1 и *R. rhodochrous* M8.

Экспрессия нитрилгидратаз штаммов *R. Ruber* gt1 и *R. erythropolis* 84 не требует их обязательного присутствия в среде.

Исследованы энзиматические свойства селективированных штаммов. На живых клетках и ферментных препаратах из *R. erythropolis* E84, *R. ruber* GT, *Rhodococcus* sp. P1, P5, *Acidovorax* sp. C-32, *P. fluorescens* C-2 исследованы субстратная специфичность, pH- и температурная зависимость ферментов, влияние на их активность ряда потенциальных ингибиторов и соединений, модифицирующих белки. Препарат нитрилгидратазы штамма *R. ruber* gt1 сохранял существенный уровень активности в интервале pH от 2 до 13 с интервалом высокой активности – от 4 до 10 и максимумом около 7,8. Нитрилгидратаза штамма *R. erythropolis* 84 была активна в диапазоне pH от 4 до 12,5, демонстрировала высокую активность при pH от 7 до 11 при максимуме около 8,5. Установлено, что нитрилгидратаза штамма *R. ruber* gt1 обладает большей стабильностью при высоких значениях температуры (максимум активности при температуре 55–60°C). Нитрилгидратаза штамма *R. erythropolis* 84 более термолабильна (стабильна до температуры 40°C, максимум активности при 30°C), но мало ингибируется низкими температура-

ми.

Положительное качество полученных культур бактерий, имеющее большое значение для разработки биотехнологии синтеза карбоновых кислот, – высокая термостабильность и связанная с ней технологическая стабильность продуцируемых ферментов. Они проявляют высокую активность при температуре от 40 до 65°C и превосходят по термостабильности многие известные аналоги (рис.7).

Проведено сравнительное исследование влияния ряда потенциальных ингибиторов ферментов и модифицирующих белки соединений на активность нитрилгидратаз. Установлено, что ферменты из двух штаммов существенно отличаются по реакции на присутствие в среде ряда ингибиторов. Активность нитрилгидратазы штамма *R. ruber* gt1 полностью подавлялась 1 мМ нитратом серебра, в то время как нитрилгидратазу *R. erythropolis* 84 наиболее сильно ингибировали одномиллимолярные хлорид трехвалентного железа, перекись водорода, 2-меркаптоэтанол, фенилгидразин и лишь частично – соль серебра. Активность нитрилгидратазы *R. ruber* gt1 также снижалась в присутствии ионов трехвалентного железа, перекиси водорода, йодацетата, фенилгидразина, хлористого цинка, сульфата алюминия. Гидроксиламин, семикарбазид, хлорид кобальта, сульфат двухвалентного железа и нитрат серебра частично снижали активность нитрилгидратазы *R. erythropolis* 84. Другие агенты оказывали меньшее влияние на активность ферментов. Повышение ионной силы реакционной среды, а также присутствие ионов кобальта или цинка несколько повышает скорость нитрилгидратазной реакции у *R. ruber* gt1.

Исследована субстратная специфичность нитрилгидратаз и нитрилаз по отношению к ряду алифатических и ароматических нитрилов. Наибольшая скорость нитрилгидратазной реакции проявляется по отношению к ацетонитрилу. Обе нитрилгидратазы активно трансформируют неразветвленные алифатические нитрилы и значительно хуже – лактонитрил и малонитрил, но сродство к отдельным

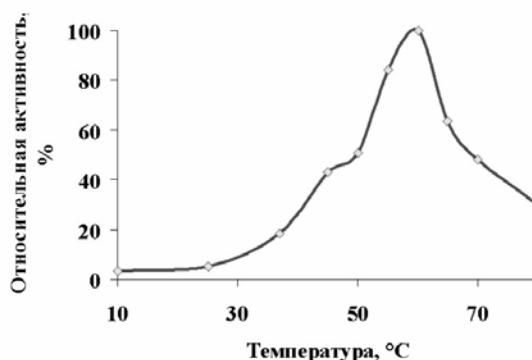


Рис. 7. Влияние температуры на активность нитрилизы *Pseudomonas fluorescens* C2

нитрилам в значительной степени различается. В отличие от фермента *R. ruber* gt1, нитрилгидратаза *R. erythropolis* 84 лучше гидратирует изобутиронитрил и адипонитрил, но очень плохо конвертирует ароматические нитрилы – бензонитрил и цианопиридин.

Изучено влияние на рост и нитрилгидратазную активность штаммов *R. ruber* gt1 и *R. erythropolis* 84 альтернативных источников азота (ацетамид, аммоний, пропионамид, нитрат натрия, нитрит натрия, метиламин, β-аланин, глицин, диметиламин, мочеви́на, ацетонитрил). Максимальная удельная активность обоих штаммов наблюдалась при использовании аммония. Штамм *R. ruber* gt1 наиболее активно рос также в присутствии аммония. Хорошими источниками азота были ацетамид, метиламин, ацетонитрил, пропионамид и нитрит. При этом нитрит и, в меньшей степени, пропионамид обеспечивали наибольший выход биомассы и наибольшую общую активность нитрилгидратазы.

Клетки *R. erythropolis* 84 максимальную скорость роста проявляли на нитрите, причем выход биомассы в этом варианте вдвое превышал выход ее на других источниках азота, но активность нитрилгидратазы была относительно низка. Также высокую скорость роста обеспечивал пропионамид. Высокую активность штамм *R. erythropolis* 84 проявлял при росте в присутствии ацетамида. β-аланин, диметиламин, и метиламин усваивались хуже других источников азота, но обеспечивали достаточно высокую ак-

тивность.

В качестве альтернативных источников углерода использовали глюкозу, сахарозу, лактозу, глицерин, сорбит, маннит, ацетамид, ацетонитрил, ацетат, лактат, пируват, или цитрат. Наиболее высокую скорость роста штамма *R. ruber* gt1 обеспечивала глюкоза. Хорошими субстратами были также маннит, сахароза, сорбит, ацетат и лактат. Медленный рост наблюдался в присутствии лактозы. Наиболее высокая нитрилгидратазная активность проявлялась при росте на ацетате, ацетамиде, ацетонитриле, лактате или глюкозе. Штамм *R. erythropolis* 84 проявлял максимальную скорость роста, выход культуры и активность в присутствии цитрата.

В образцах геномной ДНК *P. fluorescens* C2 с помощью ПЦР обнаружен фрагмент, соответствующий по размеру (1100 п.н.) гену нитриказы *Acidovorax facilis* 72W (Chauhan *et al.*, 2003). Анализ нуклеотидной последовательности позволил установить высокую (93,3 %) степень гомологии центральной части полученного фрагмента и гена нитриказы *A. facilis* 72W. На матрице ДНК из *R. erythropolis* P1a и *R. erythropolis* P3 с праймерами, комплементарными консервативным участкам генов нитрилгидратаз, были амплифицированы фрагменты ДНК размером 180 п.н., соответствующие внутренним последовательностям генов железосодержащих нитрилгидратаз, а также участки, по размеру соответствующие генам  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц железозависимой нитрилгидратазы. Таким образом, показано, что геномная ДНК *P. fluorescens* C2 содержит ген нитриказы, а геномы *R. erythropolis* P1a и *R. erythropolis* P3 – гены нитрилгидратаз.

Определена зависимость нитриказной активности клеток от фазы роста культуры. Показано, что оптическая плотность культуры *P. fluorescens* C2 достигает максимальных значений через 48 часов и сохраняется в течение 4 суток. На протяжении экспоненциальной фазы роста активность нитриказы увеличивается пропорционально плотности культуры. Макси-

мальное ( $8,0 \pm 0,4$  Ед) значение достигается через 96 часов в стационарной фазе. Высокий уровень нитриказной активности сохраняется до 6 суток с момента инокуляции среды.

Добавление ацетонитрила, пропионитрила, 3-гидроксипропионитрила, бутиронитрила, малондинитрила,  $\epsilon$ -капролактама или валеронитрила в среду культивирования достоверно увеличивало (от 142 до 248 % по отношению к контролю) активность нитриказы *P. fluorescens* C2. Другие нитрилы (изобутиронитрил, пиридин-2-карбонитрил, акрилонитрил, адипонитрил, бензонитрил, лактонитрил) не оказывают достоверного влияния на активность нитриказы данного штамма.

Показано, что активность нитрилгидратазы и амидазы *R. erythropolis* P1a может коиндуцироваться, что полностью согласуется с литературными данными (Яненко и др., 1995). При этом уровень нитрилгидролизующей активности *R. erythropolis* P3 не подвержен индуцированию.

Исследовано влияние условий культивирования на рост и нитрилгидролизующую активность. Установлено, что глюкоза, сахароза и маннит являются наилучшими источниками углерода для *P. fluorescens* C2. При росте на среде с цитратом, лактатом, пируватом или сорбитом скорость роста клеток данного штамма значительно ниже. Глицерин хуже остальных субстратов поддерживает рост *P. fluorescens* C2. Исследуемый штамм не использует в качестве субстрата лактозу. Максимальная экспрессия нитриказы обнаружена при росте на среде с глюкозой. По нашим данным, использование в качестве единственного источника углерода маннита, сорбита или цитрата приводит к заметному снижению активности фермента, а при росте на среде с ацетатом, пируватом или глицерином она составляет менее 10 % от активности в варианте с глюкозой.

Изучение влияния концентрации глюкозы в диапазоне от 0 до 30 мМ на рост и активность ферментов гидролиза нитрилов при культивировании на минеральной среде N с добавлением 10 мМ ацетонит-

рила и смеси микроэлементов позволило выявить линейное увеличение оптической плотности бактериальной культуры *P. fluorescens* C2, пропорциональное повышению содержания глюкозы в среде. Активность нитриказы *P. fluorescens* C2 достигала максимальной величины при концентрации глюкозы 10 мМ. Дальнейшее повышение содержания глюкозы приводило к постепенному снижению уровня нитриказной активности. Так, при 20 мМ глюкозы удельная активность фермента составляла 86 % от максимального значения, а при 30 мМ – 62 %. Оценка влияния концентрации ацетонитрила (0–400 мМ), на рост и нитриказную активность *P. fluorescens* C2 выявила, что увеличение содержания ацетонитрила в среде с 25 до 100 мМ приводит к заметному повышению скорости роста и выхода биомассы и возрастанию удельной активности фермента. Плотность культуры (ОП<sub>540</sub>) при этом составляла 3,74. Последующее повышение концентрации ацетонитрила до 200 мМ вызывало резкое ингибирование активности нитриказы. При повышении концентрации ацетонитрила до 400 мМ активность нитриказы уменьшалась более чем в 3 раза, а оптическая плотность снижалась до 2,28.

С целью обоснования оптимального состава среды для культивирования бактериальных штаммов исследовано влияние альтернативных источников азота на ростовые характеристики и активность нитрилгидролизующих ферментов. Наибольшая оптическая плотность культуры *P. fluorescens* C2 отмечена при добавлении β-аланина к среде. Применение ацетамида, глицина, нитрата и мочевины заметно снижало выход биомассы бактерий. Установлено, что пропионамид, метиламин и диметиламин хуже остальных поддерживают рост данного штамма. Максимальная активность нитриказы обнаружена при росте на β-аланине. Добавление глицина, ацетамида, нитрата и мочевины приводило к снижению активности фермента. При росте на пропионамиде и нитрите зарегистрирована минимальная активность нитриказы.

Исследовано влияние различных кон-

центраций аммония на рост и активность фермента. Показано, что с повышением концентрации аммония происходит увеличение оптической плотности культуры до максимума при концентрации 30 мМ. Дальнейшее повышение содержания аммония в среде до 50 мМ не вызывало статистически достоверных изменений данного показателя. Установлено, что активность нитриказы штамма *P. fluorescens* C2 линейно возрастает с увеличением концентрации аммония до 30 мМ. Дальнейшее повышение концентрации аммония до 50 мМ приводило к снижению активности фермента.

Исследование влияния источника азота и углерода на активность нитриказы показало, что при росте на различных нитрилах наблюдаются различные уровни активности фермента. При росте бактерий на бутиронитриле отмечена наибольшая активность нитриказы. Данные, полученные в ходе экспериментов, свидетельствуют о том, что оптимальным субстратом для получения наибольшего выхода биомассы клеток штамма *P. fluorescens* C2 и проявления высокой активности нитриказы являлся бутиронитрил.

Исследована субстратная специфичность нитриказы *P. fluorescens* C2. Установлено, что наилучшим субстратом для нитриказы штамма *P. fluorescens* C2 является акрилонитрил. Уровень активности фермента к ацетонитрилу был на порядок ниже, а к бензонитрилу и 3-цианопиридину более чем в 5 раз ниже, по сравнению с таковым в отношении акрилонитрила. Активность нитриказы в отношении пропионитрила, бутиронитрила, изобутиронитрила оказалась самой низкой из всех значений для исследованного ряда соединений.

Изучено влияние температуры реакции на нитриказную активность. Установлено, что максимальная нитриказная активность *P. fluorescens* C2 проявляется при 55–60°C. Дальнейшее повышение температуры реакции приводит к снижению активности фермента. Активность нитриказы при 80°C составляет 29,7 % от максимальной.

Минимальная активность нитрила-

зы штамма *P. fluorescens* C2 отмечена при pH 4,0. Повышение pH реакционной среды до 8,0 вызывало резкое увеличение ферментативной активности, при котором выявлена максимальная нитрилазная активность (11 Ед.). При повышении pH реакции до 11,0 активность фермента плавно уменьшалась и резко падала с достижением pH 12,0, составляя 23,4 % от максимальной.

Определено влияние ингибиторов на активность нитрилгидролизующих ферментов. Активность нитрилазы штамма *P. fluorescens* C2 полностью ингибируется при добавлении нитрата серебра и хлорида железа до концентрации 1,0 мМ в реакционной среде. Снижение активности нитрилазы более чем на 50 % было обнаружено при содержании в реакционной

среде солей меди и алюминия, сульфата железа, иодацетата, гидроксилamina, азидата натрия и перекиси водорода. Существенное ингибирование нитрилазной активности до 50 % оказывали соли цинка, кобальта, никеля, семикарбазид, ЭДТА и мочевины. Добавление солей натрия и лития в концентрации 10 мМ, 2-меркаптоэтанол и фенилгидразина в концентрации 1 мМ не приводило к достоверному снижению активности фермента. Полученные результаты оценки влияния ингибиторов на активность нитрилазы согласуются со свойствами аналогичных тиоловых ферментов, описанными для штаммов *R. rhodochrous* J1, *P. chlororaphis* B23, *C. nitrilophilus* ATCC21419, *B. smithii* SC-J05-1.

## РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ СИНТЕЗА ПРОИЗВОДНЫХ КАРБОНОВЫХ КИСЛОТ

Трансформацию акрилонитрила в акриловую кислоту проводили при температуре 55°C в течение 5 ч с дробным добавлением к клеточной суспензии (18 мг сухого веса с исходной активностью 4,32 Ед.) субстрата до конечной концентрации 2 % (300 мМ) каждые 30 мин. Концентрация акрилонитрила за 30 мин снижалась до следовых количеств после каждого добавления. Установлено, что при оптимальных условиях ( $t=60^{\circ}\text{C}$ , pH 8,0) 1,2 мг биомассы клеток *P. fluorescens* C2 за 30 мин способны конвертировать до 2 % акрилонитрила.

За 5 часов биотрансформации, катализируемой биомассой бактерий *P. fluorescens* C2, при оптимальных условиях реакции получается 3,0 М (20 %) раствор акриловой кислоты без образования промежуточного амида.

Технология биокаталитического получения акриламида с применением штамма *Rhodococcus ruber* Gt – продуцента термостабильной нитрилгидратазы – была апробирована в промышленном синтезе на производстве «Акрилат» Пермского завода им. С.М. Кирова; получен 40 %-ный водный раствор чистого акриламида. В результате опытных синтезов,

проведенных на ФГУП «ПЗ им. С.М. Кирова» с биокатализаторами на основе новых продуцентов, успешно получены растворы акриламида с концентрацией 55 % (рис. 8). Для получения 1 тонны акриламида требуется 1,2 кг биокатализатора. Штаммы-продуценты нитрилазы в масштабном процессе позволяют синтезировать акриловат в концентрации 20 % при отсутствии побочных продуктов и остаточного субстрата (рис. 9).

Недостатками биокаталитического



Рис. 8. Биореактор для получения активной биомассы



Рис. 9. Продукты трансформации анализируются методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ)



Рис. 10. Исследование культур бактерий методом световой микроскопии

синтеза в суспензии каталитически активной биомассы являются ее одноразовое использование и необходимость механической очистки продукта от шлама биокатализатора. Усовершенствовать технологию синтеза можно путем иммобилизации активных клеток бактерий на твердом носителе и использования полученного иммобилизованного биокатализатора в проточном реакторе.

Нами разработаны способы эффективной иммобилизации бактерий-продуцентов нитрилгидратазы на углеродных и углеродсодержащих носителях и синтеза акриламида с применением полученных биокатализаторов.

Адсорбция клеток *R. ruber* gt1 на но-

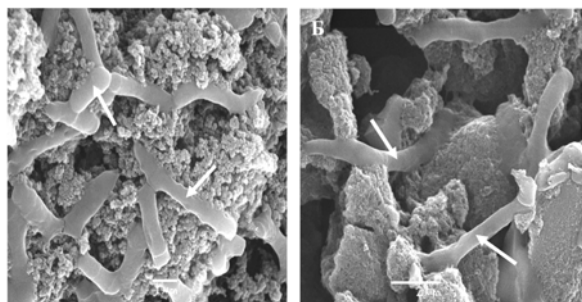


Рис. 11. Электронная микроскопия: клетки *R. ruber* gt1, адсорбированные на углеродсодержащих носителях (сibunите; керамзите с поверхностным слоем КВУ)

вых углеродсодержащих носителях изучена с помощью методов световой (рис. 10) и сканирующей электронной микроскопии. Установлено, что клетки родококков эффективно прикрепляются как к активным углям из природного материала, так и к слою КВУ (каталитического волокнистого углерода), искусственно синтезированному (Институт катализа СО РАН) на различных носителях (рис. 11).

При этом наблюдается многократное увеличение операционной стабильности нитрилгидратазы иммобилизованных бактерий по сравнению с суспендированной биомассой. Биокатализатор выдерживает высокие концентрации субстрата-акрилонитрила без потери активности, может быть использован в течение не менее 6 циклов синтеза акриламида, раствор которого на выходе из реактора не содержит клеток бактерий. Это позволяет значительно уменьшить расход биокатализатора, увеличить выход продукта синтеза, упростить технологическую схему производства, компактизировать оборудование (рис. 12), получать высокочистые концентрированные растворы амидов и карбоновых кислот. Показано, что иммобилизованная биомасса бактерий-продуцентов



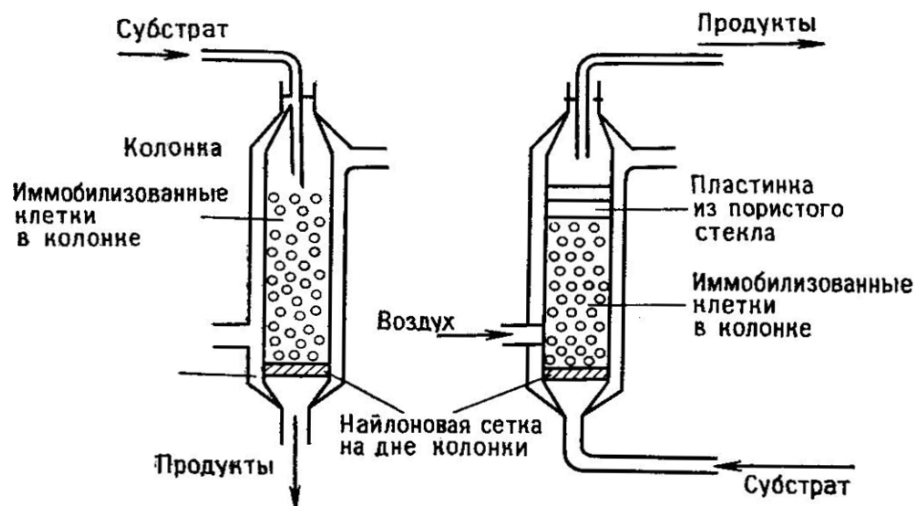


Рис. 12. Биокатализ иммобилизованными клетками бактерий в простых колоночных реакторах

нитрилгидратаз и эстераз в проточных аппаратах также способна эффективно очищать воду и воздух от загрязнения нитрилами и эфирами.

Таким образом, разработанные в ИЭГМ способы биокаталитического синтеза амидов и карбоновых кислот позволяют в мягких условиях, при небольших энергозатратах, на простом химическом оборудовании производить промышленно важные амиды и карбоновые кислоты. С внедрением этих технологий решаются проблемы получения высокочистых лекарственных препаратов; полимеров, перевязочных материалов, суперабсорбентов для медицины и личной гигиены; новых дешевых и экологически безопасных полимерных строительных материалов и присадок к связующим; полимеров для очистки питьевой воды, увеличения неф-

теотдачи, очистки промышленных стоков.

Системы с иммобилизованными бактериями-продуцентами ферментов также эффективно очищают воду и воздух от вредных примесей эфиров, нитрилов, амидов, органических кислот и других соединений.

Исследования поддержаны грантами РФФИ 07-04-96071 (р\_урал), 07-04-97617 (р-ОФИ), Министерством промышленности и науки Пермского края, программой Президиума РАН «Биоразнообразие и генетика генофондов», Отделения биологических наук РАН «Фундаментальные основы управления биологическими ресурсами», программой поддержки проектов, выполняемых в содружестве с учеными СО и ДВО.